



Synthesis and properties of 6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)-6,7-dihydro-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylic acid and its salts

S. O. Fedotov¹, A. S. Hotsulia¹

Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine

A – research concept and design; B – collection and/or assembly of data; C – data analysis and interpretation; D – writing the article; E – critical revision of the article; F – final approval of the article

Carboxylic acids and their derivatives are an important component of many biological processes. For example, they can be used to create new medicines that can be useful in the fight against various diseases. Additionally, compounds containing a thiazole moiety may possess beneficial properties in practical pharmacy. The incorporation of this heterocyclic structure in molecules can positively impact several biological characteristics, such as anti-inflammatory, antiviral, and antifungal activities.

Consequently, exploring novel compounds that combine a thiazole fragment with a carboxyl group holds promise for the advancement of new drugs and diagnostic tools that can contribute significantly to the battle against numerous diseases.

The aim of the work was to create a number of organic and inorganic salts of 6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)-6,7-dihydro-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylic acid and study of their properties, as well as selective determination of the biological potential of these compounds.

Materials and methods. The synthetic part of the study involved the sequential synthesis of the original compound 4-amino-5-(3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)-1,2,4-triazole-3-thiol using a well-established method described in previous articles. The next stage involved the reaction of thiol with 2,3-dichlorobenzaldehyde in a medium of glacial acetic acid. The resulting Schiff base was subsequently reacted with 2-chloroethanoic acid in tetrahydrofuran in the presence of an equimolar amount of sodium hydride.

Salts of the corresponding acid were formed during the reaction of 6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)-6,7-dihydro-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylic acid with both organic and inorganic bases in an aqueous-alcohol medium. The structures of all synthesized compounds were determined using ¹H NMR spectroscopy and elemental analysis. Additionally, the individuality of each compound was confirmed using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry.

Results. The study determined the optimal conditions for the formation of both organic and inorganic salts of 6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)-6,7-dihydro-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylic acid. The analysis of pharmacokinetic parameters and physicochemical properties using ADME (absorption, distribution, metabolism, and excretion) allowed for the identification of promising synthesized compounds and the selection of more optimal compounds for further investigation.

Conclusions. The structure of 12 compounds was synthesized and confirmed. Physical-chemical and pharmacokinetic analysis of ADME parameters was carried out and promising compounds were selected for more *in-depth* research.

Key words: 1,2,4-triazole, pyrazole, properties, *in silico* research

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(2), 121-129

Синтез і властивості 6-(2,3-дихлорофеніл)-3-(3-метил-1H-піразол-5-іл)-6,7-дигідро-5H-[1,2,4]тріазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазин-7-карбонової кислоти та її солей

С. О. Федотов, А. С. Гоцуля

Карбонові кислоти та їхні похідні – важлива складова багатьох біологічних процесів. Так, вони можуть бути використані для створення нових лікарських засобів для терапії пацієнтів із різними захворюваннями. Сполуки, що містять тіазоловий фрагмент, також можуть бути корисними в практичній фармації. Наявність цього гетероциклу в структурі може позитивно вплинути на низку біологічних властивостей, включаючи протизапальні, протівірусні та протигрибкові.

Отже, дослідження нових молекул, які поєднують фрагмент тіазолу та карбоксильну групу, може сприяти розробленню діагностичних і лікарських засобів, що можна застосовувати під час лікування багатьох захворювань.

ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/279460>

UDC 547.792:77.03/.04.057.06/.07:004
DOI: [10.14739/2409-2932.2023.2.279460](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2023.2.279460)

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(2), 121-129

Key words: 1,2,4-triazole, pyrazole, properties, *in silico* research.

*E-mail: serjooolegovich@gmail.com

Received: 25.04.2023 // Revised: 18.05.2023 // Accepted: 30.05.2023

Мета роботи – створення ряду органічних і неорганічних солей 6-(2,3-дихлорофеніл)-3-(3-метил-1*H*-піразол-5-іл)-6,7-дигідро-5*H*-[1,2,4]тріазол-[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-карбонової кислоти та дослідження їхніх властивостей, а також вибіркоче встановлення біологічного потенціалу цих сполук.

Матеріали та методи. Реалізація синтетичної частини передбачала поетапний синтез вихідного 4-аміно-5-(3-метил-1*H*-піразол-5-іл)-1,2,4-тріазол-3-тіолу за відомим методом, що описаний у попередніх статтях. Наступний етап – реакція тіолу з 2,3-дихлорбензальдегідом у середовищі льодяної оцтової кислоти. Одержану основу Шиффа надалі піддавали реакції з 2-хлоретановою кислотою в середовищі тетрагідрофурану за наявності еквімолекулярної кількості натрій гідриду. Солі відповідної кислоти утворювалися в процесі реакції 6-(2,6-дихлорофеніл)-3-(3-метил-1*H*-піразол-5-іл)-6,7-дигідро-5*H*-[1,2,4]тріазолу-[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-карбонової кислоти з органічними та неорганічними основами в водно-спиртовому середовищі. За допомогою ¹H ЯМР-спектроскопії та елементного аналізу визначили структуру всіх синтезованих речовин. Метод високоефективної рідинної хромато-мас-спектрометрії підтвердив індивідуальність кожної сполуки.

Результати. Встановили оптимальні умови створення органічних і неорганічних солей 6-(2,3-дихлорофеніл)-3-(3-метил-1*H*-піразол-5-іл)-6,7-дигідро-5*H*-[1,2,4]тріазол[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-карбонової кислоти. Застосування аналізу фармакокінетичних параметрів і фізико-хімічних властивостей ADME дало змогу визначити перспективність синтезованих сполук і обрати оптимальні з них для наступних досліджень.

Висновки. Синтезовано та підтверджено структуру 12 сполук. Здійснили фізико-хімічний і фармакокінетичний аналіз ADME параметрів, обрали перспективні сполуки для детальнішого дослідження.

Ключові слова: 1,2,4-тріазол, піразол, властивості, *in silico* дослідження.

Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2023. Т. 16, № 2(42). С. 121-129

Optimizing synthesis conditions and studying the properties of new compounds are always of great importance to the field of chemistry. In this case, 6-(2,3-dichlorophenyl)-3-(3-methyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-6,7-dihydro-5*H*-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylic acid and its salts have significant potential for use in the pharmaceutical industry [2,7,8,12].

The triazolothiadiazine framework has demonstrated significant biological activity, including antibacterial, antiviral, antitumor, and antifungal properties [3,9]. Furthermore, the pyrazole component is a well-established bioactive moiety present in drugs such as celecoxib and metformin. Combining these two heterocycles in a single molecule holds the potential for developing new drugs with enhanced pharmacological properties and pronounced activity [4,6,11].

Moreover, the synthesis of new compounds with unique properties is essential for the discovery and development of drugs, and this particular compound can serve as a starting point for further research aimed at optimizing its pharmacological activity [5,10]. Therefore, establishing optimal synthesis conditions and studying the properties of 6-(2,3-dichlorophenyl)-3-(3-methyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-6,7-dihydro-5*H*-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylic acid and its salts represents a relevant and important direction in the field of medicinal chemistry.

Aim

The aim of the work was to create a number of organic and inorganic salts of 6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(3-methyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-6,7-dihydro-5*H*-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylic acid and study of their properties, as well as selective determination of the biological potential of these compounds.

Materials and methods

The synthetic part of the study involved the sequential synthesis of the original compound 4-amino-5-(3-methyl-1*H*-

pyrazol-5-yl)-1,2,4-triazole-3-thiol using a well-established method described in previous articles [1].

The first stage of the study focused on optimizing the synthesis conditions for 6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(3-methyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-6,7-dihydro-5*H*-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylic acid and its corresponding salts.

The synthetic process involved three stages. In the first stage, a nucleophilic addition reaction of 2,6-dichlorobenzaldehyde to the original 4-amino-5-(3-methyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-4*H*-1,2,4-triazole-3-thiol was carried out in glacial acetic acid. The second stage involved the reaction of the obtained Schiff's base with 2-chloroethanoic acid in tetrahydrofuran, with the addition of double the amount of sodium hydride. The mixture was stirred for 10 hours, followed by solvent removal, resulting in the formation of 6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(3-methyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-6,7-dihydro-5*H*-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylic acid. The final stage of the study involved synthesizing salts of the obtained acid by reacting it with inorganic and organic bases in an aqueous-alcohol medium. An ADME analysis was conducted to assess the compounds' compliance with pharmacokinetic parameters and drug-likeness.

Melting points were determined using the "Stanford Research Systems Melting Point Apparatus 100" (SRS, USA) in open capillaries. The percentage content of elements (C, H, N, S) was performed using the "Elementar vario EL cube" analyzer (Elementar Analysensysteme, Germany). IR spectroscopy (spectral range 4000–400 cm⁻¹) was performed using the Bruker ALPHA FT-IR spectrometer with the ALPHA-T module (Bruker optics, Germany). ¹H NMR spectra were recorded on a Varian-Mercury 400 spectrometer with tetramethylsilane as an internal standard in DMSO-*d*₆ solution. Chromatograph "Agilent 1260 Infinity HPLC" with spectrometer "Agilent 6120" was used to obtain chromatogram-mass spectra, utilizing the electrospray (ESI) ionization method.

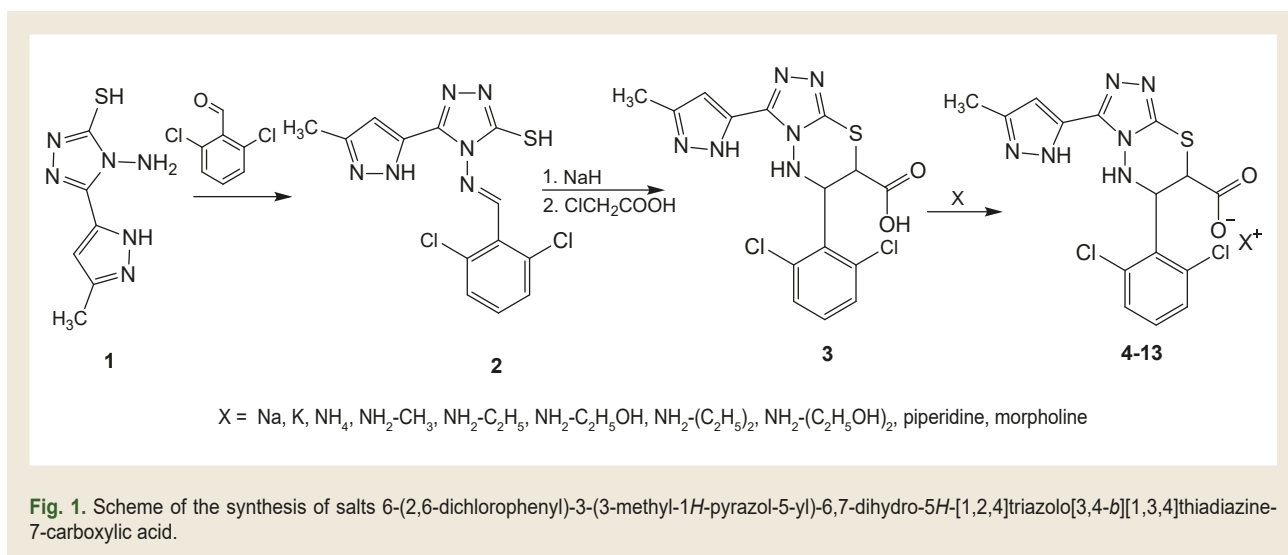


Fig. 1. Scheme of the synthesis of salts 6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)-6,7-dihydro-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylic acid.

(E)-4-((2,6-dichlorobenzylidene)amino)-5-(3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol. To 0.01 mol of the original 4-amino-5-(3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol was added 0.01 mol of 2,6-dichlorobenzaldehyde in 20 ml of glacial ethanoic acid. They heated for two hours. The formed precipitate was filtered, washed with water and used without purification in the next stage.

6-(2,6-Dichlorophenyl)-3-(3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)-6,7-dihydro-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylic acid. 2.0 mmol of sodium hydride was added to a solution of compound 2 (1.0 mmol) in dry tetrahydrofuran (20 ml) at room temperature. It was left for salt formation at the temperature for 15 minutes. Then 2-chloroethanoic acid (1.5 mmol) was added and the solution was stirred for 10 hours. The solvent was removed under a vacuum. The residue was crystallized from ethanol to obtain triazolothiadiazines.

General method of synthesis of salts 6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)-6,7-dihydro-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylic acid. To 0.01 mol of the original acid was dissolved in 10 ml of a mixture of water : ethanol (1:1), 0.01 mol of the corresponding inorganic base (KOH, NaOH) and organic (NH₄OH, NH₂-CH₃, NH₂-C₂H₅, NH₂-C₂H₄OH, NH₂-(C₂H₅)₂, NH₂-(C₂H₄OH)₂, piperidine, morpholine). It was heated for two hours. The solvent was removed under a vacuum. The precipitate was crystallized from a water-alcohol mixture of water : ethanol (1:1).

ADME analysis. The evaluation of absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME) is a crucial aspect of drug development. These factors significantly impact the pharmacokinetics, pharmacological activity, and effectiveness of a medicinal product.

In recent years, computer technologies have been employed for the preliminary assessment of pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. This approach offers a cost-effective alternative to in vitro and in vivo experiments. Notably, drug-like criteria are utilized for the optimization and evaluation of virtual combinatorial libraries. The web tool "SwissADME" was used in this study to calculate physicochemical, pharmacokinetic, and drug-likeness parameters for the proposed structures.

Results

The synthetic part of the study was conducted using two approaches and involved the reaction of the initial thiol with 2,6-dichlorobenzaldehyde, resulting in the formation of a Schiff base.

The formation of the acid took place with the participation of a previously obtained Schiff base and 2-chloroethanoic acid in a tetrahydrofuran environment. Salts of the corresponding acid were synthesized as a result of the reaction of organic and inorganic salts with acid in a water-alcohol medium (Fig. 1).

The synthesized substances are white crystalline powders, soluble in water.

The structure of all synthesized substances was confirmed by physicochemical methods: ¹H NMR spectroscopy and elemental analysis. The purity of the chemical reaction products and their identity were confirmed by chromatography-mass spectra.

6-(2,6-Dichlorophenyl)-3-(3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)-6,7-dihydro-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylic acid. White residue; yield 80 %; m. p. 183–185 °C. ¹H NMR, δ (ppm): 11.45 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H, COOH, NH-pyrazole), 7.63 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, H-4 pyrazole), 7.43–7.30 (m, 3H, H-3,4,5 2,6-Cl-C₆H₃), 6.63 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, N-NH-), 5.89–5.84 (m, 1H, C⁶H, thiadiazine), 5.15 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, C⁷H, thiadiazine), 2.53 (s, 3H, CH₃-pyrazole). C₁₅H₁₂Cl₂N₆O₂S. ESI-MS: *m/z* = 411 [M+H]⁺. Elemental Analysis: C, 43.81; H, 2.94; N, 20.44; S, 7.80. Found: C, 43.70; H, 2.95; N, 20.38; S, 7.82. Crystallized from propan-2-ole.

The structure of inorganic salts was proved by data of elemental analysis.

Sodium 6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)-6,7-dihydro-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylate. White residue; yield 75 %; m. p. 243–245 °C. C₁₅H₁₁Cl₂N₆NaO₂S. ESI-MS: *m/z* = 434 [M+H]⁺. Elemental Analysis: C, 41.59; H, 2.56; N, 19.40; S, 7.40. Found: C, 41.45; H, 2.55; N, 19.45; S, 7.42. Crystallized from propan-2-ole.

Potassium 6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)-6,7-dihydro-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylate. White residue; yield 77 %; m. p. 252–254 °C. $C_{15}H_{11}Cl_2N_6KO_2S$. ESI-MS: $m/z = 450 [M+H]^+$. Elemental Analysis: C, 40.09; H, 2.47; N, 18.70; S, 7.13. Found: C, 40.19; H, 2.46; N, 18.74; S, 7.11. Crystallized from propan-2-ole.

Ammonium 6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)-6,7-dihydro-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylate. White residue; yield 78 %; m. p. 221–223 °C. 1H NMR, δ (ppm): 11.46 (s, 1H, NH-pyrazole), 10.23 (s, 3H, NH_3^+), 7.64 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, H-4 pyrazole), 7.43–7.30 (m, 3H, H-3,4,5 2,6-Cl- C_6H_3), 6.45 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, N-NH), 5.92–5.86 (m, 1H, C^6H , thiadiazine), 5.45 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H, C^7H , thiadiazine), 2.55 (s, 3H, CH_3 -pyrazole). $C_{15}H_{14}Cl_2N_7O_2S$. ESI-MS: $m/z = 428 [M+H]^+$. Elemental Analysis: C, 42.28; H, 3.29; N, 22.90; S, 7.52. Crystallized from propan-2-ole.

Methylammonium 6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)-6,7-dihydro-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylate. White residue; yield 71 %; m. p. 216–218 °C. 1H NMR, δ (ppm): 11.44 (s, 1H, NH-pyrazole), 9.30 (s, 2H, NH_2 -CH₃), 7.65 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-4 pyrazole), 7.43–7.30 (m, 3H, H-3,4,5 2,6-Cl- C_6H_3), 6.45 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, N-NH), 5.94–5.87 (m, 1H, C^6H , thiadiazine), 5.35 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, C^7H , thiadiazine), 2.62 (t, $J = 3.9$ Hz, 3H, NH_2 -CH₃), 2.53 (s, 3H, CH_3 -pyrazole). $C_{16}H_{16}Cl_2N_7O_2S$. ESI-MS: $m/z = 442 [M+H]^+$. Elemental Analysis: C, 43.55; H, 3.65; N, 22.22; S, 7.26. Found: C, 43.66; H, 3.66; N, 22.16; S, 7.24. Crystallized from propan-2-ole.

Ethylammonium 6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)-6,7-dihydro-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylate. White residue; yield 80 %; m. p. 204–206 °C. 1H NMR, δ (ppm): 11.46 (s, 1H, NH-pyrazole), 9.25 (s, 2H, NH_2 -CH₂-CH₃), 7.67 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-4 pyrazole), 7.43–7.30 (m, 3H, H-3,4,5 2,6-Cl- C_6H_3), 6.43 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, N-NH), 5.91–5.85 (m, 1H, C^6H , thiadiazine), 5.33 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, C^7H , thiadiazine), 3.03–2.89 (m, 2H, NH_2 -CH₂-CH₃), 2.53 (s, 3H, CH_3 -pyrazole), 1.38 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H, NH_2 -CH₂-CH₃). $C_{17}H_{18}Cl_2N_7O_2S$. ESI-MS: $m/z = 456 [M+H]^+$. Elemental Analysis: C, 44.84; H, 3.98; N, 21.53; S, 7.04. Found: C, 44.72; H, 3.99; N, 21.58; S, 7.02. Crystallized from propan-2-ole.

Monoethanolammonium 6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)-6,7-dihydro-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylate. White residue; yield 80 %; m. p. 201–202 °C. 1H NMR, δ (ppm): 11.47 (s, 1H, NH-pyrazole), 9.15 (s, 2H, NH_2 -CH₂-CH₂-OH), 7.63 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, H-4 pyrazole), 7.41–7.28 (m, 3H, H-3,4,5 2,6-Cl- C_6H_3), 6.46 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, N-NH), 5.93–5.88 (m, 1H, C^6H , thiadiazine), 5.35 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, C^7H , thiadiazine), 4.65 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, NH_2 -CH₂-CH₂-OH), 3.96–3.91 (m, 2H, NH_2 -CH₂-CH₂-OH), 3.32–3.28 (m, 2H, NH_2 -CH₂-CH₂-OH), 2.52 (s, 3H, CH_3 -pyrazole). $C_{17}H_{18}Cl_2N_7O_3S$. ESI-MS: $m/z = 472 [M+H]^+$. Elemental Analysis: C, 43.32; H, 3.85; N, 20.80; S, 6.80. Found: C,

43.43; H, 3.86; N, 20.75; S, 6.77. Crystallized from propan-2-ole.

Diethylammonium 6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)-6,7-dihydro-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylate. White residue; yield 80 %; m. p. 196–198 °C. 1H NMR, δ (ppm): 11.46 (s, 1H, NH-pyrazole), 9.88 (s, Hz, 1H, $NH(C_2H_5)_2$), 7.59 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, H-4 pyrazole), 7.43–7.30 (m, 3H, H-3,4,5 2,6-Cl- C_6H_3), 6.44 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, N-NH), 5.91–5.85 (m, 1H, C^6H , thiadiazine), 5.39 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H, C^7H , thiadiazine), 3.27–3.16 (m, 4H, $NH-(CH_2)_2-(CH_3)_2$), 2.55 (s, 3H, CH_3 -pyrazole), 1.52 (t, $J = 7.5$ Hz, 6H, $NH-(CH_2)_2-(CH_3)_2$). $C_{19}H_{22}Cl_2N_7O_2S$. ESI-MS: $m/z = 484 [M+H]^+$. Elemental Analysis: C, 47.21; H, 4.59; N, 20.28; S, 6.63. Found: C, 47.32; H, 4.60; N, 20.38; S, 7.79. Crystallized from propan-2-ole.

***N,N*-Diethylhydroxylammonium 6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)-6,7-dihydro-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylate.** White residue; yield 80 %; m. p. 181–183 °C. 1H NMR, δ (ppm): 11.43 (s, 1H, NH-pyrazole), 9.27 (s, 1H, $NH-(CH_2)_2-(CH_2)_2-(OH)_2$), 7.61 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, H-4 pyrazole), 7.46–7.31 (m, 3H, H-3,4,5 2,6-Cl- C_6H_3), 6.46 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, N-NH), 5.94–5.87 (m, 1H, C^6H , thiadiazine), 5.42 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H, C^7H , thiadiazine), 4.59 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, $NH-(CH_2)_2-(CH_2)_2-(OH)_2$), 4.05–3.98 (m, 4H, $NH-(CH_2)_2-(CH_2)_2-(OH)_2$), 3.58–3.49 (m, 4H, $NH-(CH_2)_2-(CH_2)_2-(OH)_2$), 2.52 (s, 3H, CH_3 -pyrazole). $C_{19}H_{22}Cl_2N_7O_4S$. ESI-MS: $m/z = 516 [M+H]^+$. Elemental Analysis: C, 44.28; H, 4.30; N, 19.02; S, 6.22. Found: C, 44.17; H, 4.29; N, 19.07; S, 6.25. Crystallized from propan-2-ole.

Piperidinium 6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)-6,7-dihydro-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylate. White residue; yield 80 %; m. p. 217–219 °C. 1H NMR, δ (ppm): 11.48 (s, 1H, NH-pyrazole), 9.60 (s, 1H, NH -piperidine), 7.63 (d, 1H, d, $J = 7.1$ Hz, 1H, H-4 pyrazole), 7.43–7.30 (m, 3H, H-3,4,5 2,6-Cl- C_6H_3), 6.43 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, N-NH), 5.93–5.88 (m, 1H, C^6H , thiadiazine), 5.39 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H, C^7H , thiadiazine), 3.40–3.29 (m, 4H, H-2,6 piperidine), 2.51 (s, 3H, CH_3 -pyrazole), 2.34–2.15 (m, 4H, H-3,5 piperidine), 1.55–1.42 (m, 1H, H-4 piperidine). $C_{20}H_{22}Cl_2N_7O_2S$. ESI-MS: $m/z = 496 [M+H]^+$. Elemental Analysis: C, 48.49; H, 4.48; N, 19.79; S, 6.47. Found: C, 48.60; H, 4.49; N, 19.74; S, 6.44. Crystallized from propan-2-ole.

Morpholinium 6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)-6,7-dihydro-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylate. White residue; yield 80 %; m. p. 169–171 °C. 1H NMR, δ (ppm): 11.46 (s, 1H, NH-pyrazole), 8.68 (s, 1H, NH -morpholine), 7.61 (d, 1H, d, $J = 7.1$ Hz, 1H, H-4 pyrazole), 7.44 (m, 3H, H-3,4,5 2,6-Cl- C_6H_3), 6.45 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, N-NH), 5.95–5.89 (m, 1H, C^6H , thiadiazine), 5.40 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H, C^7H , thiadiazine), 4.18–4.05 (m, 4H, H-3,3',5,5' morpholine), 3.57–3.44 (m, 4H, H-2,2',6,6' morpholine), 2.53 (s, 3H, CH_3 -pyrazole). $C_{19}H_{20}Cl_2N_7O_3S$. ESI-MS: $m/z = 497 [M+H]^+$. Elemental Analysis: C, 45.88; H, 4.05; N, 19.71; S, 6.45. Found: C, 45.77; H, 4.06; N, 19.65; S, 6.49. Crystallized from propan-2-ole.

Discussion

The ^1H NMR spectra analysis revealed characteristic peaks for the synthesized acid were established in the form of an extended proton signal of the COOH group at 11.45 ppm. The presence of singlet signals at 11.48–11.43 ppm is caused by the presence of a hydrogen atom of the pyrazole fragment and the methyl group associated with it at 2.55–2.51 ppm. The formation of a doublet at 7.67–7.61 ppm corresponds to the hydrogen atom of the C^4H -pyrazole fragment. Protons of the 2,6-dichlorophenyl substituent were noted as an extended multiplet in the characteristic “aromatic zone” at 7.46–7.28 ppm. The formation of triazolothiadiazine was characterized by the absence of protons from the amino group of the original thiol, as well as the presence of a multiplet at 5.95–5.85 ppm, which characterizes the C^6H -thiadiazine fragment, and a doublet at 5.45–5.33 ppm, which corresponds to the C^7H -thiadiazine fragment.

The ^1H NMR spectra of the salts were confirmed by the signals of the corresponding protonated amines. Thus, in the spectrum of diethylammonium salt, multiplets are observed in the interval 9.88–9.83 ppm, 3.27–3.16 ppm and a triplet at 1.40–1.33 ppm in accordance. In the spectrum of diethylmonoethanolammonium salt there were three multiplets at 9.27–9.21 ppm, 4.05–3.98 ppm and 3.58–3.49 ppm and the signal of OH groups in the form of a triplet at 4.59 ppm. The spectrum of the morpholine salt had a characteristic set of signals of the protonated morpholine cation in the form of two multiplets at 4.18–4.05 ppm, 3.57–3.44 ppm and singlet at 8.68 ppm. The piperidinium salt was characterized by proton signals of organic bases in the form of multiplets of 3.40–3.29 ppm, 2.34–2.15 ppm, and 1.55–1.42 ppm and singlet 9.60 ppm.

Tables 1–5 provide a prediction of the results of the virtual ADME analysis of the obtained series of compounds. Based on the results of the analysis of physical-chemical indicators, we have the following results: most compounds meet the established criteria for molecular weight (from 150 g/mol to 500 g/mol). At the same time, only compounds **4** and **5** meet the established criteria for the topological plane of the polar surface (from 20 to 130 Å²), the flexibility of the molecule (no more than 9 rotational bonds), and molecular refraction (from 40 to 130) (Table 1). The only exceptions are compound **11** exceeds the allowable molecular weight and **12** exceeds the allowable molecular refraction. A significant part of the compounds, including the reference drug, has a low level of molecular saturation since the ratio of sp^3 -hybridized carbon atoms for saturation should be at least 0.25 [14].

Using ADME analysis, the consensus value of lipophilicity $\log \text{Po/w}$, which is the arithmetic mean of five different predictive values (XLOGP3, WLOGP, MLOGP, SILICOS-IT), is calculated by different methods (Table 2). For example, iLOGP takes Gibbs energy into account and is calculated using GB/SA in water and *n*-octanol. According to studies, MLOGP should be less than 4.15, XLOGP3 should be in the range of -0.7 to +5.0 [15,16], and WLOGP should be less than 5.88 [13]. The majority of compounds from the virtual library correspond to these lipophilicity criteria (Table 2).

An important factor for parenterally administered drugs is their solubility in water (expressed in $\log S$ values), which determines the amount of active substance that can be administered in a small therapeutic dose (Table 3). The solubility class is usually evaluated on a $\log S$ scale, where “insoluble” < -10 < “poorly soluble” < -6 < “moderately soluble” < -4 < “soluble” < -2 < “well soluble” < 0 < “highly soluble” [13]. According to the ESOL model, the expected values of $\log S$ should not exceed -6. Studies have shown that celecoxib and inorganic salts are sparingly soluble in water according to ESOL, while salts of organic origin are highly soluble. Thus, most of the compounds contained in the virtual library can find application in the form of parenteral dosage forms. In addition, an analysis of the pharmacokinetic properties of compounds contained in the library was conducted. The smaller the value of $\log K_p$ (expressed in cm/s), the less the molecule penetrates the skin [17,18]. Therefore, the synthesized salts of the virtual library have $\log K_p$ values in the range from -6.40 to -9.86 cm/s, which means that not all of them can be used to create ointments.

Oral administration of medication is the most convenient for the patient, although other methods exist. It is important to know that compounds that are passively absorbed in the gastrointestinal tract, such as celecoxib, are not P-glycoprotein substrates, except as salts. Knowing about this is important for understanding multidrug resistance (MDR), which can become a serious obstacle to the successful treatment of many diseases. The phenomenon of MLS consists of the fact that cells or the body become insensitive to a number of drugs of different chemical structures and with different mechanisms of action. This is particularly important because P-gp protects the central nervous system against xenobiotics. In addition, the five main isoforms of cytochromes P450 (CYP) (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, etc.) are important for the elimination of drugs from the body. As a result, it turned out that all compounds, except for celecoxib, are not inhibitors of cytochromes (Table 4). Medicines that are inhibitors of cytochromes are more slowly removed from the body.

According to the filters used by major pharmaceutical companies (Lipinski (Pfizer), Ghose (Amgen), Veber (GSK), Egan (Pharmacia) and Muegge (Bayer)), the synthesized compounds had small deviations from Lipinski’s rule according to two criteria: $\text{MW} > 350$, $\text{XLOGP3} > 3.5$, just like celecoxib according to the $\text{MW} > 350$ criterion, $\text{XLOGP3} > 3.5$ (Table 5).

The SwissADME bioavailability radar is used to assess the drug-likeness of compounds (Fig. 2). This radar considers six physicochemical properties such as lipophilicity, size, polarity, solubility, flexibility, and saturation. The range of each property is defined by descriptors and shown as a pink area. The radar plot of a molecule must fall entirely within this region to be considered drug-like. Most of the compounds do not correspond to drug similarity according to the polarity criterion (POLAR). However, celecoxib cannot be considered drug-like either, but according to the criterion of saturation (INSATU), which also applies to the compounds shown in the graph (Fig. 2).

Table 1. Physical-chemical properties of salts 6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(3-methyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-6,7-dihydro-5*H*-[1,2,4]triazole[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylic acid

No. compounds	MW, g/mol	BA	ABA	Csp ³	OZ	H-BAN	H-BDN	Ref.	TPSA, Å ²
Celecoxib	381.37	26	17	0,12	4	7	1	89,96	86,36
3	411.27	26	16	0.20	3	5	3	101.24	134.02
4	433.25	27	16	0.20	4	5	2	99.70	123.02
5	449.36	27	16	0.20	4	5	2	99.70	123.02
6	428.30	27	16	0.20	3	5	3	105.28	136.85
7	442.32	28	16	0.25	3	5	3	110.18	164.49
8	456.35	29	16	0.29	3	5	3	114.99	164.49
9	473.36	30	16	0.29	4	6	5	118.10	181.89
10	484.40	31	16	0.37	5	5	3	124.70	153.46
11	516.40	33	16	0.37	7	7	5	127.02	193.92
12	496.41	32	16	0.40	3	5	3	131.01	153.46
13	498.39	32	16	0.37	3	6	3	127.29	162.69

MW: molecular weight; **BA:** number of heavy atoms; **ABA:** number of aromatic heavy atoms; **Csp³:** Carbon atoms in sp³-hybridization; **OZ:** number of rotational bonds; **H-BAN:** number of H-bond acceptors; **H-BDN:** number of H-bond donors; **Ref:** molar refractive power; **TPSA:** topological polar surface area.

Table 2. Lipophilicity of salts 6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(3-methyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-6,7-dihydro-5*H*-[1,2,4]triazole[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylic acid

Compounds	iLOGP	XLOGP3	WLOGP	MLOGP	SILICOS-IT	Consensus
Celecoxib	2.56	3.40	5.75	2.65	2.63	3.40
3	1.55	3.27	2.23	2.98	2.13	2.43
4	0.00	3.58	2.15	2.98	1.03	1.95
5	0.00	3.58	2.15	2.98	1.13	1.97
6	0.00	0.26	1.27	-1.49	2.13	0.44
7	2.39	0.27	-0.25	-1.25	2.13	0.66
8	2.73	0.64	0.14	-1.02	2.13	0.93
9	2.54	-0.41	0.45	-1.79	2.13	0.59
10	3.45	1.52	0.49	-0.57	2.13	1.41
11	2.76	-0.58	-1.57	-2.10	2.13	0.13
12	3.41	1.63	0.25	-0.35	2.13	1.41
13	3.06	0.41	-0.90	-1.34	2.13	0.67

Table 3. Solubility in water (Log S) salts 6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(3-methyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-6,7-dihydro-5*H*-[1,2,4]triazole[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylic acid

Com-pounds	ESOL	mg/ml; mol/l	p	Ali	mg/ml; mol/l	p	SILI-COS-IT	mg/ml; mol/l	p
Celecoxib	-4.57	1.04e-02 mg/ml; 2.71e-05 mol/l	MS	-4.89	4.88e-03 mg/ml; 1.28e-05 mol/l	MS	-6.22	2.29e-04 mg/ml; 6.01e-07 mol/l	MS
3	-4.71	8.07e-03 mg/ml; 1.96e-05 mol/l	MS	-5.76	7.17e-04 mg/ml; 1.74e-06 mol/l	MS	-5.07	3.52e-03 mg/ml; 8.57e-06 mol/l	MS
4	-4.96	4.79e-03 mg/ml; 1.11e-05 mol/l	MS	-5.85	6.13e-04 mg/ml; 1.41e-06 mol/l	MS	-5.44	1.58e-03 mg/ml; 3.65e-06 mol/l	MS
5	-5.06	3.95e-03 mg/ml; 8.79e-06 mol/l	MS	-5.85	6.35e-04 mg/ml; 1.41e-06 mol/l	MS	-5.48	1.49e-03 mg/ml; 3.33e-06 mol/l	MS
6	-2.90	5.39e-01 mg/ml; 1.26e-03 mol/l	S	-2.69	8.65e-01 mg/ml; 2.02e-03 mol/l	S	-5.07	3.67e-03 mg/ml; 8.57e-06 mol/l	MS
7	-2.98	4.66e-01 mg/ml; 1.05e-03 mol/l	S	-3.29	2.29e-01 mg/ml; 5.18e-04 mol/l	S	-5.07	3.79e-03 mg/ml; 8.57e-06 mol/l	MS

Cont. of Table 3.

Com-pounds	ESOL	mg/ml; mol/l	p	Ali	mg/ml; mol/l	p	SILI-COS-IT	mg/ml; mol/l	p
8	-3.28	2.38e-01 mg/ml; 5.21e-04 mol/l	S	-3.67	9.77e-02 mg/ml; 2.14e-04 mol/l	S	-5.07	3.91e-03 mg/ml; 8.57e-06 mol/l	MS
9	-2.65	1.07e+00 mg/ml; 2.25e-03 mol/l	S	-2.95	5.37e-01 mg/ml; 1.13e-03 mol/l	S	-5.07	4.06e-03 mg/ml; 8.57e-06 mol/l	MS
10	-3.85	6.80e-02 mg/ml; 1.40e-04 mol/l	S	-4.35	2.16e-02 mg/ml; 4.45e-05 mol/l	MS	-5.07	4.15e-03 mg/ml; 8.57e-06 mol/l	MS
11	-2.57	1.38e+00 mg/ml; 2.67e-03 mol/l	S	-3.02	4.91e-01 mg/ml; 9.51e-04 mol/l	S	-5.07	4.43e-03 mg/ml; 8.57e-06 mol/l	MS
12	-4.12	3.79e-02 mg/ml; 7.64e-05 mol/l	MS	-4.47	1.70e-02 mg/ml; 3.43e-05 mol/l	MS	-5.07	4.25e-03 mg/ml; 8.57e-06 mol/l	MS
13	-3.36	2.17e-01 mg/ml; 4.36e-04 mol/l	S	-3.39	2.02e-01 mg/ml; 4.04e-04 mol/l	S	-5.07	4.27e-03 mg/ml; 8.57e-06 mol/l	MS

S: soluble; MS: moderately soluble.

Table 4. Pharmacokinetics of salts 6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)-6,7-dihydro-5H-[1,2,4]triazole[3,4-b][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylic acid

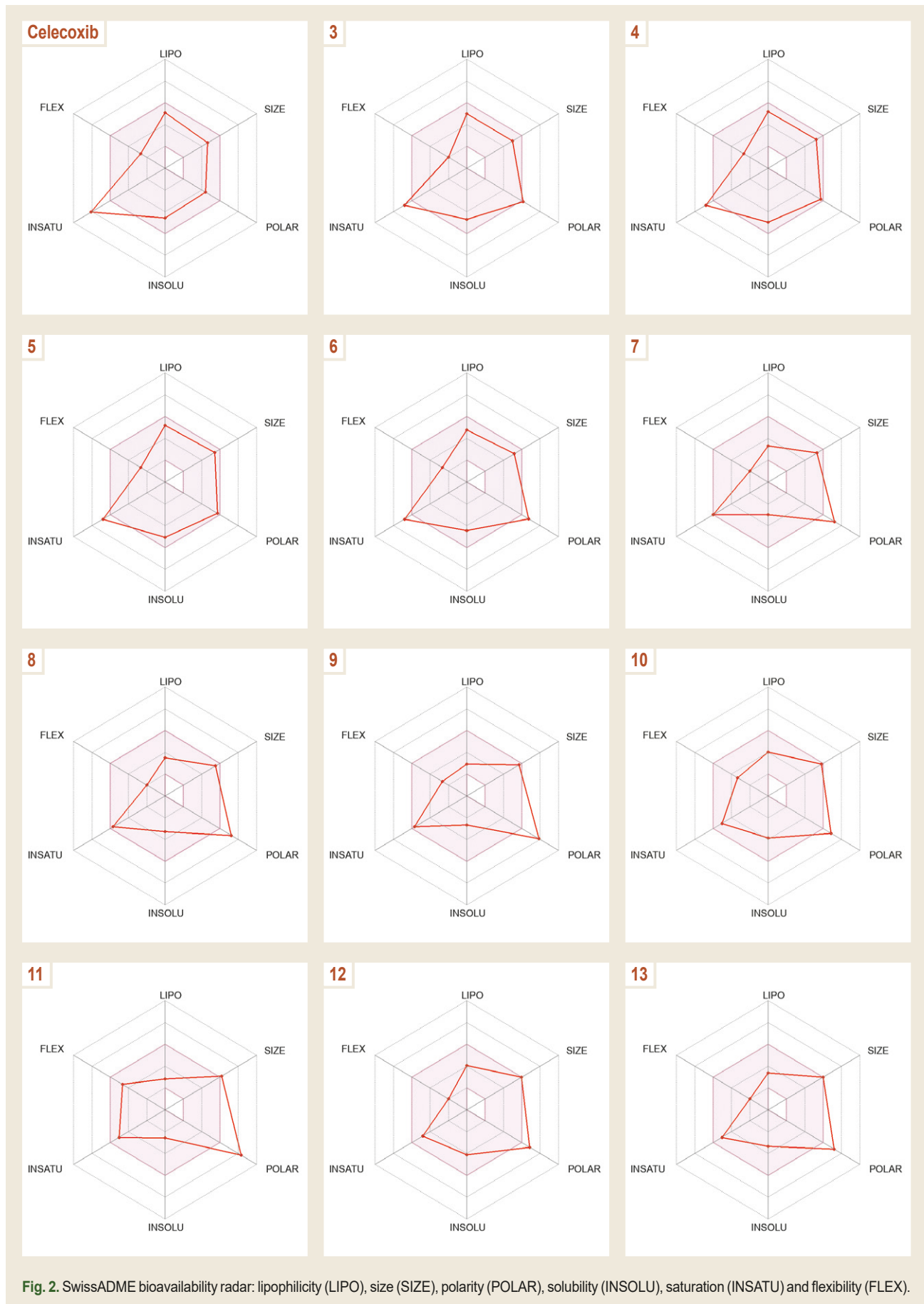
Compounds	GI-absorption*	BBB**	P-gp substrate**	Inhibitor CYP1A2	Inhibitor CYP2C19	Inhibitor CYP2C9	Inhibitor CYP2D6	Inhibitor CYP3A4 i	Log Kp ^{##}
Celecoxib	High	–	–	+	–	+	–	–	-6.21
3	High	–	–	–	–	–	–	–	-6.49
4	High	–	+	–	+	–	–	–	-6.40
5	High	–	+	–	+	–	–	–	-6.50
6	High	–	+	–	–	–	–	–	-8.73
7	Low	–	+	–	–	–	–	+	-8.81
8	Low	–	+	–	–	–	–	+	-8.63
9	Low	–	+	–	–	–	–	+	-9.48
10	Low	–	+	–	–	–	–	+	-8.18
11	Low	–	+	–	–	–	–	+	-9.86
12	Low	–	+	–	–	–	–	+	-8.17
13	Low	–	+	–	–	–	–	+	-9.05

*: gastrointestinal absorption; **: blood-brain barrier, **: P-glycoprotein; #: penetration through the skin.

Table 5. Similarity and aspects of medicinal chemistry for salts 6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)-6,7-dihydro-5H-[1,2,4]triazole[3,4-b][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylic acid

Compounds	Bioavailability, Abbot	Synthetic assessment of accessibility	Brenk's warning	Warning PAINS	Leader associations; violation
Celecoxib	0.55	4.26	0	0	No; 2, MW>350, XLOGP3>3.5
3	0.56	4.22	0	0	No; 1 MW>350
4	0.55	4.26	0	0	No; 2: MW>350, XLOGP3>3.5
5	0.55	4.26	0	0	No; 2: MW>350, XLOGP3>3.5
6	0.55	4.36	0	0	No; 1, MW>350
7	0.55	4.47	0	0	No; 1, MW>350
8	0.55	4.58	0	0	No; 1, MW>350
9	0.55	4.65	0	0	No; 1, MW>350
10	0.55	4.79	0	0	No; 1, MW>350
11	0	4.81	0	0	No; 1, MW>350
12	0.55	4.80	0	0	No; 1, MW>350
13	0.55	4.74	0	0	No; 1, MW>350

Drug similarity matching according to Lipinski (Pfizer), Ghose (Amgen), Veber (GSK), Egan (Pharmacia) and Muegge (Bayer) filters – Yes, violations – 0.



Conclusions

1. The method of synthesis of 6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(3-methyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-6,7-dihydro-5*H*-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylic acid and its salts was investigated.

2. The structure of the synthesized acids and salts was confirmed using modern physical-chemical methods of organic analysis.

3. The physical-chemical properties, lipophilicity criteria, solubility, pharmacokinetics, and drug-likeness were established using the SwissADME service. The parameters of the synthesized compounds were determined and compared with the reference drug celecoxib.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.
Конфлікт інтересів: відсутній.

Information about authors:

Fedotov S. O., PhD-student of the Department of Natural Sciences for Foreign Students and Toxicological Chemistry, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

ORCID ID: 0000-0002-0421-5303

Hotsulia A. S., PhD, DSc, Associate Professor of the Department of Natural Sciences for Foreign Students and Toxicological Chemistry, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

ORCID ID: 0000-0001-9696-221X

Відомості про авторів:

Федотов С. О., асистент каф. природничих дисциплін для іноземних студентів та токсикологічної хімії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

Гоцуля А. С., д-р фарм. наук, доцент каф. природничих дисциплін для іноземних студентів та токсикологічної хімії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

References

- Fedotov S. O., & Hotsulia A. S. (2022). Synthesis and properties of 3-(ethylthio)-9-methyl-6-(alkylthio) pyrazolo[1,5-*d*][1,2,4]triazolo[3,4-*f*][1,2,4]triazines. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*, 15(3), 227-234. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2022.3.263994>
- Voskoboinik, O. Y., Kolomoets, O. S., Kovalenko, S. I., & Shishkina, S. V. (2017). [1,2,4]Triazino[2,3-*c*]quinazolines 1. Methods for the preparation and spectral characteristics of substituted 3-*R*-1-6-*R*-3-6,7-dihydro-2*H*-[1,2,4]triazino[2,3-*c*]quinazolin-2-ones. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 53(8), 892-904. <https://doi.org/10.1007/s10593-017-2142-5>
- Voskoboinik, O. Y., Stavtyskiy, V. V., Antypenko, O. M., Kazunin, M. S., Kravtsov, D. V., Shishkina, S. V., & Kovalenko, S. I. (2020). Synthesis and structure of pyrido[1,2-*a*]quinazoline condensed derivatives. *Synthetic Communications*, 50(13), 2043-2051. <https://doi.org/10.1080/00397911.2020.1762223>
- Can, N. Ö., Acar Çevik, U., Sağlık, B. N., Levent, S., Korkut, B., Özkay, Y., Kaplancikli Z., & Kopardal, A. S. (2017). Synthesis, Molecular Docking Studies, and Antifungal Activity Evaluation of New Benzimidazole-Triazoles as Potential Lanosterol 14 α -Demethylase Inhibitors. *Journal of Chemistry*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9387102>
- Shcherbyna, R., Panasenko, O., Polonets, O., Nedorezaniuk, N., & Duchenko, M. (2021). Synthesis, antimicrobial and antifungal activity of ylidenhydrazides of 2-((4-*R*-5-*R*,-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetaldehydes. *Ankara Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi*, 45(3), 504-514. <https://doi.org/10.33483/jfpau.939418>
- Chaban, Z., Harkov, S., Chaban, T., Klenina, O., Ogurtsov, V., & Chaban, I. (2017). Recent advances in synthesis and biological activity evaluation of condensed thiazoloquinazolines: A review. *Pharmacia*, 64(3), 52-66.
- Aleksandrova, K. V., Levich, S. V., Mykhalchenko, Ye. K., & Sinchenko, D. M. (2016). Synthesis and physical-chemical properties of 3-aryl-(aralkyl)-8-hydrazinemethylxanthines and their *N*-substituted derivatives. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*, (2), 26-31. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2016.2.70906>
- Li, Y. S., Tian, H., Zhao, D. S., Hu, D. K., Liu, X. Y., Jin, H. W., Song, G. P., & Cui, Z. N. (2016). Synthesis and bioactivity of pyrazole and triazole derivatives as potential PDE4 inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 26(15), 3632-3635. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.06.002>
- Suhak, O. A., Panasenko, O. I., Knysch, Ye. G., & Kamyshny, O. M. (2015). Protymikrobna ta protyhyrbkova aktivnist pokhidnykh 3-(alkiltio)-4-*R*-5-(tiofen-2-ilmetyl)-4*H*-1,2,4-triazoliv [Antibacterial and antifungal activity of derivatives 3-(alkylthio)-4-*R*-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4*H*-1,2,4-triazole]. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*, (3), 67-70. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2015.3.52625>
- Kaplaushenko, A. G. (2013). Doslidzhennia zi stvorennia novoho oryhnalnoho vitchyznianoho likarskoho zasobu na osnovi 1,2,4-triazolu [The Research of Creating a New Original Domestic Drug Based on 1,2,4-triazole]. *Naukovyi zhurnal MOZ Ukrainy*, (2), 115-121. [in Ukrainian].
- Mykhalchenko, Y., Aleksandrova, K., Shkoda, O., & Pruglo, Y. (2019). Prospective biological active compounds among 7-substituted of 3-benzyl-8-propylxanthines for treatment of metabolic syndrome pathologies. *Eureka: Health Sciences*, (5), 52-58. <https://doi.org/10.21303/2504-5679.2019.00988>
- Safonov, A. A. (2020). Method of synthesis novel *N*'-Substituted-2-((5-(Thiophen-2-ylmethyl)-4*H*-1,2,4-Triazol-3-yl)Thio) acetohydrazides. *Ankara Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi*, 44(2), 242-252. <https://doi.org/10.33483/jfpau.580011>
- Karpenko, Y., Omelyanchik, L., & Panasenko, T. (2018). Experimental and theoretical spectroscopic study of thione-thiol tautomerism of new hybrides 1,3,4-oxadiazole-2-thion with acridine-9(10*H*)-one. *Chemistry and Chemical Technology*, 12(4), 419-428. <https://doi.org/10.23939/chcht12.04.419>
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific reports*, 7, 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Lovering, F., Bikker, J., & Humblet, C. (2009). Escape from flatland: increasing saturation as an approach to improving clinical success. *Journal of medicinal chemistry*, 52(21), 6752-6756. <https://doi.org/10.1021/jm901241e>
- Moriguchi, I., Hirono, S., Liu, Q., Nakagome, Izum., & Matsushita, Y. (1992). Simple Method of Calculating Octanol/Water Partition Coefficient. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 40(1), 127-130. <https://doi.org/10.1248/cpb.40.127>
- Cheng, T., Zhao, Y., Li, X., Lin, F., Xu, Y., Zhang, X., Li, Y., Wang, R., & Lai, L. (2007). Computation of octanol-water partition coefficients by guiding an additive model with knowledge. *Journal of chemical information and modeling*, 47(6), 2140-2148. <https://doi.org/10.1021/ci700257y>
- Potts, R. O., & Guy, R. H. (1992). Predicting skin permeability. *Pharmaceutical research*, 9(5), 663-669. <https://doi.org/10.1023/a:1015810312465>



Спектрофотометричне дослідження дубильних речовин у траві *Achillea millefolium* L.

Г. П. Смойловська^{id}*A,C,F, О. О. Малюгіна^{id}B,D, О. К. Єренко^{id}D, Т. В. Хортецька^{id}E

Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті; F – остаточне затвердження статті

Дубильні речовини – важливий клас вторинних метаболітів із широким спектром фармакологічних ефектів, завдяки яким їх використовують у різноманітних сферах медицини. У рослинах роду *Achillea* L. дубильні речовини – клас сполук, що домінують. Це дає змогу застосовувати рослину сировину та екстракти деревію для розроблення складних рослинних і комбінованих рецептур лікарських засобів. Пошук нових джерел природних дубильних сполук для фармацевтичних і косметичних цілей викликає великий інтерес і спонукає до удосконалення методів фітохімічного дослідження відомих видів лікарських рослин.

Мета роботи – розроблення методики спектрофотометричного визначення кількісного складу дубильних речовин у перерахунку на галову кислоту в деревію звичайного (*Achillea millefolium* L.) траві.

Матеріали і методи. Для дослідження використовували повітряно-суху сировину – деревію звичайного траву. Кількісний вміст поліфенолів у перерахунку на пірогалол у рослинній сировині визначали за допомогою модифікованого методу УФ-спектрофотометрії. Під час розроблення методики спектрофотометричного визначення дубильних речовин у деревію звичайного траві в перерахунку на галову кислоту враховували вплив концентрації екстрагента та ступеня подрібнення рослинної сировини.

Результати. Кількісний вміст поліфенолів у водному витягу з деревію звичайного траву в перерахунку на пірогалол становив $2,9781 \pm 0,0177$ %. Розмір частинок сировини суттєво впливає на вихід діючих речовин. Оптимальними технологічними параметрами для розробленої методики є екстрагування рослинної сировини, подрібненої до 0,5–1,0 мм, 70 % етанолом у співвідношенні 1:10 ($4,08 \pm 0,01$ %).

Висновки. Результати дослідження дають підстави рекомендувати застосування методики у перерахунок на галову кислоту для визначення дубильних речовин у спирто-водних екстрактах деревію.

Ключові слова: *Achillea millefolium* L., дубильні речовини, спектрофотометричні дослідження, пірогалол, галова кислота.

Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2023. Т. 16, № 2(42). С. 130-134

Spectrophotometric study of tannins in the herb *Achillea millefolium* L.

H. P. Smoilovska, O. O. Maliuhina, O. K. Yerenko, T. V. Khortetska

Tannins are an important class of secondary metabolites with a wide range of pharmacological effects, due to which they are used in various fields of treatment. In plants of the genus *Achillea* L., tannins are the dominant class of compounds. This allows the use of plant raw materials and extracts of yarrow for the development of complex herbal and combined formulations of medicines. The search for new sources of natural tannin compounds for pharmaceutical and cosmetic purposes is of significant interest and encourages the improvement of phytochemical research methods of known species of medicinal plants.

The aim of the work was to develop a spectrophotometric method for determining the quantitative composition of tannin compounds in terms of gallic acid in the herb of *Achillea millefolium* L.

Materials and methods. The study utilized dried air-dried raw material of yarrow for analysis. The quantitative content of polyphenols in the plant material was determined using a modified UV spectrophotometric method, with calculations based on pyrogallol equivalents. The development of the spectrophotometric technique for determining tannins from the herb of *Achillea millefolium* L., expressed as gallic acid equivalents, considered the effects of extractant concentration and the degree of plant material grinding.

Results. The water extract from the herb of *Achillea millefolium* L. exhibited a quantitative content of polyphenols, calculated as pyrogallol equivalents, at $2,9781 \pm 0,0177$ %. It was observed that the particle size of the raw material significantly influenced the yield of active substances. The optimal technological parameters for the developed method involved extracting plant material that was crushed to a size of 0.5–1.0 mm, using 70 % ethanol in a ratio of 1:10, resulting in a yield of 4.08 ± 0.01 %.

ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/281344>

UDC 615.322:582.998.16].074:543.42
DOI: 10.14739/2409-2932.2023.2.281344

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(2), 130-134

Key words: *Achillea millefolium* L., дубильні речовини, спектрофотометричні дослідження, пірогалол, галова кислота.

*E-mail: smoilovskaj@ukr.net

Received: 23.05.2023 // Revised: 08.06.2023 // Accepted: 19.06.2023

Conclusions. Based on the obtained results, it is recommended to utilize the developed method, employing gallic acid equivalents, for the quantification of tannins in alcohol-water extracts of yarrow.

Key words: *Achillea millefolium* L., tannins, spectrophotometric study, pyrogallol, galic acid.

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(2), 130-134

Рід деревій (*Achillea* L.) – один із найбільших у родині Айстрові, нараховує, за різними даними, 100–140 видів, що поширені переважно в Північній півкулі [1–3]. Завдяки поширеності та розмаїттю видів, біологічно активні сполуки, що містить деревій, ефективно використовують як активні інгредієнти в медицині, ветеринарії та косметології [1,4–6]. Багатий компонентний склад вторинних метаболітів представників видів роду *Achillea* L. дає змогу застосовувати їх для лікування гепатобіліарної системи та шлунково-кишкового тракту, а також як кровоспинний засіб, що має виражену регенеративну та протизапальну активність завдяки підтвердженому антисептичним та антимікробними властивостям [3,5,6].

Рослинні препарати деревію ефективно застосовують для лікування розладів менструального циклу, полегшення менструальних спазмів і болю, для зниження артеріального тиску, лікування інфекцій верхніх дихальних шляхів [1,7–9]. Деякі сполуки, що містяться в ефірній олії, показали високий потенціал щодо руйнування активного центру протеаз і можуть бути застосовані в дослідженнях для виявлення ефективних засобів проти SARS-CoV [10].

Різноманітні біологічні ефекти *Achillea* spp. зумовлені наявністю в його траві та екстрактах широкого спектра натуральних компонентів. Найпоширенішими сполуками є флавоноїди, фенолкарбонові кислоти, терпени, фітостероли, органічні та жирні кислоти, дубильні речовини, кумарини, амінокислоти, полісахариди, саліцилова кислота, вітаміни С та К [2,4,7,8,11–13].

Одна з груп біологічно активних сполук, що домінують у траві деревію, – рослинні феноли, а їхніми важливими представниками є дубильні речовини.

Дубильні речовини (таніни) – цінні вторинні метаболіти, що мають широкий спектр фармакологічних властивостей, їх використовують у різних сферах медицини. Застосування танінів під час зовнішнього лікування запобігає виникненню багатьох хронічних захворювань шкіри. Дубильні сполуки також можуть впливати на шлунково-кишковий тракт, включаючи антиоксидантну дію, поглинання вільних радикалів, протимікробну, протівірусну, антимуґагенну, антиканцерогенну, гепатопротекторну активності, а також виявляють себе як інгібітор шкідливого прооксидантного ферменту. Крім того, вони характеризуються в'язучими й антисептичними властивостями завдяки зв'язуванню та осадженню з різними білковими молекулами [14,15].

Під час розроблення основ складних рослинних і комбінованих рецептур інноваційних лікарських засобів із використанням природних джерел дубильних речовин поєднують традиційні знання та останні наукові розробки. Тому пошук нових джерел природних дубильних

сполук для фармацевтичних, медичних і косметичних цілей викликає науковий інтерес [15,16].

Вивченню хімічного складу деревію звичайного нині приділяють чимало уваги [1,7–9,11,12]. За даними Державної Фармакопеї України (ДФУ) 2.0, для визначення якості рослинної сировини деревію рекомендовано здійснювати кількісне спектрофотометричне визначення поліфенолів, до яких належать дубильні речовини [17]. Однак досі є певні проблеми щодо стандартизації сировини деревію. Згідно з результатами попередніх тонкошарових досліджень, у деревію траві встановили більший вміст галлової кислоти. Тому актуально вважаємо модифікацію спектрофотометричної методики визначення дубильних речовин у перерахунку на галову кислоту.

Мета роботи

Розроблення методики спектрофотометричного визначення кількісного складу дубильних речовин у перерахунку на галову кислоту в деревію звичайного (*Achillea millefolium* L.) траві.

Матеріали і методи дослідження

Для дослідження використовували верхівки деревію звичайного траві завдовжки до 20 см, що зібрані в період цвітіння рослин на півдні України. Рослинну сировину висушували за температури 35 °С. Під час аналізу використовували повітряно-суху сировину.

Кількісний вміст поліфенолів у перерахунку пірогалолу в рослинній сировині визначали модифікованим методом УФ-спектрофотометрії [17].

Аналітичну пробу рослинної сировини подрібнювали до розміру 0,5–1,0 мм. Точну наважку (0,4 г) поміщали в конічну колбу ємністю 100 мл, додавали 80 мл води очищеної та нагрівали протягом 30 хв на водяній бані, охолоджували під проточною водою та фільтрували у мірну колбу місткістю 100 мл. Конічну колбу ополіскували водою очищеною та переносили рідину в мірну колбу, доводили до 100 мл (розчин А). У мірну колбу на 25 мл вносили 5 мл розчину А, доводили водою очищеною до позначки (розчин А₁). У мірну колбу на 25 мл вміщували 2 мл розчину А₁, додавали 1 мл фосфорно-молібденово-вольфрамового реактиву, 10 мл води очищеної перемішували та доводили до позначки натрію карбонатом Р (розчин А₂). Через 30 хв вимірювали оптичну густину за довжини хвилі 760 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм на спектрофотометрі Lambda 365 UV/vis (Perkin Elmer, USA), як компенсаторну рідину використовували воду очищену.

Паралельно вимірювали оптичну густину стандартного розчину пірогалолу, який готували перед випробуванням. Точну наважку пірогалолу (0,05 г), вміщували у

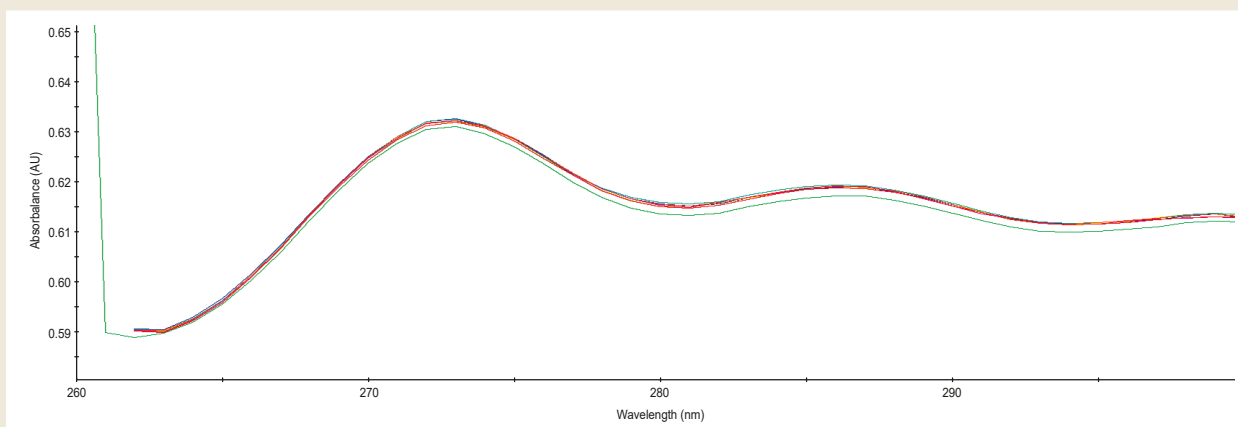


Рис. 1. Результат спектрофотометричного визначення вмісту дубильних речовин у деревію звичайного трави.

Таблиця 1. Метрологічні характеристики результатів дослідження дубильних речовин у перерахунку на пірогалол у траві *Achillea millefolium* (n = 6)

Найменування рослини	Метрологічні характеристики							
	\bar{x}	S	S_x	p	t (p, v)	Δx	$\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$	$\bar{\epsilon}$
<i>Achillea millefolium</i>	2,98	0,27	0,01	0,95	1,943	0,052	2,98 ± 0,02	1,77

мірну колбу ємністю 100 мл і розчиняли у воді очищеній (розчин В). У мірну колбу на 100 мл вносили 5 мл розчину 1, доводили водою очищеною до позначки (розчин В₁). У мірну колбу на 25 мл вміщували 2 мл розчину 2, додавали 1 мл фосфорно-молібденово-вольфрамового реактиву, 10 мл води очищеної перемішували та доводили до позначки натрію карбонатом Р (розчин В₂). Через 30 хв вимірювали оптичну густину розчину В₂ за довжини хвилі 760 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, як компенсаторну рідину використовували воду очищену.

Методику спектрофотометричного визначення дубильних речовин у перерахунку на галову кислоту розробляли, враховуючи вплив розміру частинок сировини та концентрації екстрагенту на вихід діючих речовин. Рослинну сировину подрібнювали до розмірів 0,5–1,0 мм, 2–3 мм та 5–6 мм. Як екстрагент використовували спирт етиловий 40 %, 70 % і 96 %. Співвідношення сировини й екстрагенту становило 1:10.

Для спектрофотометричного визначення 5,0 г подрібненої сировини деревію звичайного поміщали в конічну колбу місткістю 100 мл з притертою пробкою, заливали 50 мл спиртом етиловим, закривали пробкою та зважували. Колбу нагрівали на водяній бані за температури 50–60 °С протягом години. Охолоджували, зважували, доводили етиловим спиртом до початкової маси. Вміст фільтрували крізь сухий паперовий фільтр у колбу на 50 мл (розчин С). У мірну колбу на 20 мл переносили 2 мл фільтрату С і доводили етанолом до позначки (розчин С₁). У мірну колбу на 25 мл вміщували 1 мл розчину С₁ (розчин С₂). Оптичну густину розчину С₂ вимірювали на спектрофотометрі за довжини хвилі 273 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Компенсаційний розчин – етиловий спирт такої самої концентрації.

Паралельно вимірювали оптичну густину стандартного зразка галової кислоти. Для його приготування 0,01 г галової кислоти розчиняли в етиловому спирті відповідної концентрації в мірній колбі на 25 мл (розчин D). У мірну колбу на 50 мл переносили 1 мл одержаного розчину D, доводили спиртом етиловим до позначки (розчин D₁). Вимірювали оптичну густину розчину D₁ у кюветі з товщиною шару 10 мм. Як компенсаційний розчин застосовували етиловий спирт тієї самої концентрації.

Статистично результати досліджень опрацювали методами математичної статистики, застосувавши пакет прикладних програм Microsoft Office Excel. Статистичне опрацювання результатів хімічних експериментів здійснили за методикою ДФУ [18].

Для оцінювання статистичної значущості міжгрупових відмінностей результатів застосовували параметричний t-критерій Стьюдента у разі нормального розподілу, непараметричний U-критерій Манна-Вітні – при відхиленні від закону нормального розподілу. Статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$ (95 %).

Результати

Для рослинної сировини деревію обґрунтованим є здійснення стандартизації за вмістом поліфенольних сполук згідно з ДФУ 2.0, а саме дубильних речовин [17].

Кількісний вміст поліфенолів у деревію трави, визначений методом спектрофотометрії, в перерахунку на пірогалол становив $2,9781 \pm 0,0177$ % (табл. 1).

Здійснили також кількісне визначення дубильних речовин у перерахунку на кислоту галову (рис. 1). Результати досліджень наведено в таблиці 2.

Таблиця 2. Кількісний вміст дубильних речовин у деревію звичайного трави в перерахунку на галову кислоту, ($\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$) %, $n = 6$, $p = 95$ %

Ступінь подрібнення, мм	Концентрація етилового спирту, %	Кількісний вміст дубильних речовин, %
0,5–1,0	40	3,27 ± 0,01
0,5–1,0	70	4,08 ± 0,01
0,5–1,0	96	3,24 ± 0,01
2–3	40	2,52 ± 0,01
2–3	70	2,40 ± 0,01
2–3	96	2,02 ± 0,02
5–6	40	2,37 ± 0,01
5–6	70	2,17 ± 0,02
5–6	96	1,94 ± 0,01

Технологічними параметрами для розробленої методики є екстрагування рослинної сировини, подрібненої до 0,5–1,0 мм, із застосуванням 70 % спирту етилового у співвідношенні 1:10 (4,08 ± 0,01 %).

Обговорення

Біологічна активність рослинної сировини деревію значною мірою зумовлена вмістом поліфенольних сполук. Пірогалол і галова кислота як представники класу дубильних речовин викликають останнім часом чималий науковий інтерес завдяки експериментально доведеним даним щодо їхньої фармакологічної активності як поглиначів радикалів.

Галова кислота має потенційний профілактичний і терапевтичний вплив при багатьох захворюваннях, що пов'язані з розвитком окиснювального стресу, включаючи серцево-судинні захворювання, рак, нейродегенеративні розлади та старіння. Серед властивих їй біологічних ефектів – антибактеріальний, протигрибковий, протівірусний, протизапальний, антиоксидантний, протипухлинний, протидіабетичний тощо [19]. Завдяки цьому галова кислота та її похідні є перспективними сполуками для розроблення нових ліків.

Під час розроблення екстракційних лікарських засобів обирають спосіб екстрагування, час екстракції, екстрагент, розмір частинок сировини, враховуючи структуру та фізико-хімічні властивості біологічно активних речовин, що містяться в рослинній сировині.

У разі вибору як екстрагента води очищеної обґрунтованим є застосування методики визначення поліфенолів, що запропонована ДФУ 2.0, для перевірки якості отриманого витягу. У методиці використовують дешевий і доступний розчинник, але спектрофотометричне дослідження пов'язане з певними труднощами, оскільки одержаний забарвлений комплекс швидко змінює свої властивості та потребує вимірювання точно через 30 хвилин.

Разом із тим, у разі вибору як екстрагента спирту етилового більш переколивим є здійснення спектрофотометричного дослідження вмісту дубильних речовин за

допомогою запропонованої методики – в перерахунку на галову кислоту.

Під час попереднього оцінювання технологічних параметрів отримання екстракту перевіряли співвідношення кількості сировини з екстрагентом. Доведено, що оптимальним є співвідношення 1:10. Розмір частинок рослинної сировини суттєво впливає на вихід діючих речовин, і найкращий вихід корелює з розміром матеріалу, що проходить через сита з розміром отворів 0,5 мм. Найменші результати отримують у разі застосування сировини розміром 5–6 мм (типовий для рослинної сировини, що випускається в пачках і застосовується споживачами). Крім того, на перехід галової кислоти до екстракту впливає концентрація застосовуваного етилового спирту. При розмірі частинок сировини 2–3 мм і 5–6 мм кращі результати одержали в разі екстрагування спиртом етиловим 40 % (2,52 ± 0,01 % і 2,37 ± 0,01 % відповідно). Дещо меншу концентрацію отримали, коли застосовували спирт етиловий 70 % (2,40 ± 0,01 % та 2,17 ± 0,02 %). При зменшенні частинок рослинної сировини значно збільшився вихід діючих речовин: 3,27 ± 0,01 % у разі екстрагування 40 % спиртом етиловим, 4,08 ± 0,01 % – 70 % спиртом етиловим. Застосування як екстрагента 96 % спирту етилового дає найменший вихід дубильних речовин.

Порівняння двох методик визначення кількісного вмісту поліфенолів (дубильних речовин) дає підстави зробити висновок про доцільність застосування методики у перерахунку на галову кислоту під час дослідження водно-спиртових витягів деревію звичайного трави у зв'язку з більшою точністю та простотою застосування.

Висновки

1. Досліджено вміст поліфенолів у лікарській рослинній сировині деревію звичайного у перерахунку на пірогалол, що становив 2,9781 ± 0,0177 %.

2. Розроблено методику спектрофотометричного визначення кількісного вмісту дубильних речовин у перерахунку на галову кислоту в *Achillea millefolium* L. траві (4,08 ± 0,01 %). Технологічними параметрами методики є екстрагування рослинної сировини, подрібненої до 0,5–1,0 мм, із застосуванням 70 % спирту етилового у співвідношенні 1:10.

3. Результати дають підстави рекомендувати розроблену методику для визначення дубильних речовин у спирто-водних екстрактах деревію в зв'язку з її більшою точністю та простотою застосування.

Перспективи подальших досліджень. Результати дослідження є підґрунтям для розроблення технології одержання рідкого екстракту деревію звичайного трави. Наступні фітохімічні та фармакологічні дослідження будуть основою для створення лікарського засобу з антиоксидантною та протизапальною діями.

Фінансування

Дослідження виконане в рамках НДР Запорізького державного медичного університету: «Фармакогностичне й екологічне дослідження перспективних видів родин флори України»

з метою стандартизації рослинної сировини та одержання лікарських засобів», № держреєстрації 0117U006960 (2017–2021).

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Відомості про авторів:

Смойловська Г. П., канд. фарм. наук, доцент каф. управління і економіки фармації та фармацевтичної технології, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0002-6272-2012](https://orcid.org/0000-0002-6272-2012)

Малюгіна О. О., канд. фарм. наук, старший викладач каф. управління і економіки фармації та фармацевтичної технології, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0002-4909-4250](https://orcid.org/0000-0002-4909-4250)

Єренко О. К., канд. фарм. наук, старший викладач каф. управління і економіки фармації та фармацевтичної технології, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0003-1502-6281](https://orcid.org/0000-0003-1502-6281)

Хортецька Т. В., канд. фарм. наук, доцент каф. управління і економіки фармації та фармацевтичної технології, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0001-7344-5295](https://orcid.org/0000-0001-7344-5295)

Information about authors:

Smoilovska H. P., PhD, Associate Professor of the Department of Pharmacy Management and Economics, and Pharmaceutical Technology, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

Maliuhina O. O., PhD, Senior Lecturer of the Department of Pharmacy Management and Economics, and Pharmaceutical Technology, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

Yerenko O. K., PhD, Senior Lecturer of the Department of Pharmacy Management and Economics, and Pharmaceutical Technology, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

Khortetska T. V., PhD, Associate Professor of the Department of Pharmacy Management and Economics, and Pharmaceutical Technology, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

References

- Agar, O. T., Dikmen, M., Ozturk, N., Yilmaz, M. A., Temel, H., & Turkmenoglu, F. P. (2015). Comparative Studies on Phenolic Composition, Antioxidant, Wound Healing and Cytotoxic Activities of Selected *Achillea* L. Species Growing in Turkey. *Molecules*, *20*(10), 17976-18000. <https://doi.org/10.3390/molecules201017976>
- Salehi, B., Selamoglu, Z., Sevindik, M., Fahmy, N. M., Al-Sayed, E., El-Shazly, M., Csupor-Löffler, B., Csupor, D., Yazdi, S. E., Sharifi-Rad, J., Arserim-Uçar, D. K., Arserim, E. H., Karazhan, N., Jahani, A., Dey, A., Azadi, H., Vakili, S. A., Sharopov, F., Martins, N., & Büsselberg, D. (2020). *Achillea* spp.: A comprehensive review on its ethnobotany, phytochemistry, phytopharmacology and industrial applications. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, *66*(4), 78-103. <https://doi.org/10.14715/cmb/2020.66.4.13>
- Ali, S. I., Gopalakrishnan, B., & Venkatesalu, V. (2017). Pharmacognosy, Phytochemistry and Pharmacological Properties of *Achillea millefolium* L.: A Review. *Phytotherapy research : PTR*, *31*(8), 1140-1161. <https://doi.org/10.1002/ptr.5840>
- Strzępek-Gomółka, M., Gawel-Bęben, K., & Kukula-Koch, W. (2021). *Achillea* Species as Sources of Active Phytochemicals for Dermatological and Cosmetic Applications. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2021*, 6643827. <https://doi.org/10.1155/2021/6643827>
- Tadić, V., Arsić, I., Zvezdanović, J., Zugić, A., Cvetković, D., & Pavkov, S. (2017). The estimation of the traditionally used yarrow (*Achillea millefolium* L. Asteraceae) oil extracts with anti-inflammatory potential in topical application. *Journal of ethnopharmacology*, *199*, 138-148. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.02.002>
- El-Kalamouni, C., Venskutonis, P. R., Zebib, B., Merah, O., Raynaud, C., & Talou, T. (2017). Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oil of *Achillea millefolium* L. Grown in France. *Medicines*, *4*(2), 30. <https://doi.org/10.3390/medicines4020030>
- Garzoli, S., Cicaloni, V., Salvini, L., Trespidi, G., Iriti, M., & Vitalini, S. (2023). SPME-GC-MS Analysis of the Volatile Profile of Three Fresh Yarrow (*Achillea millefolium* L.) Morphotypes from Different Regions of Northern Italy. *Separations*, *10*(1). <https://doi.org/10.3390/separations10010051>
- Duyun, I. F., Mazulin, O. V., Mazulin, G. V., & Oproshanska, T. V. (2020). Khimichnyi sklad polifenolnykh spolkov u travi dereviiu podovoho (*Achillea micranthoides* Klok.) [The chemical composition of polyphenolic compounds *Achillea micranthoides* Klok. herbs]. *Farmatsevtichnyi zhurnal*, *75*(1), 80-87. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.32352/0367-3057.1.20.09>
- Serdar, G., Sökmen, M., Demir, E., Sökmen, A., & Bektaş, E. (2016). Extraction of antioxidative principles of *Achillea biserrata* M. Bieb. and chromatographic analyses. *International Journal of Secondary Metabolite*, *2*(2), 3-15. <https://doi.org/10.21448/ijsm.240706>
- Angourani, H. R., Zarei, A., Moghadam, M. M., Ramazani, A., & Mastinu, A. (2023). Investigation on the Essential Oils of the *Achillea* Species: From Chemical Analysis to the In Silico Uptake against SARS-CoV-2 Main Protease. *Life*, *13*(2), 378. <https://doi.org/10.3390/life13020378>
- Marinas, I. C., Oprea, E., Gaboreanu, D. M., Gradisteanu Pircalabioru, G., Buleandra, M., Nagoda, E., Badea, I. A., & Chifiriuc, M. C. (2023). Chemical and Biological Studies of *Achillea setacea* Herba Essential Oil-First Report on Some Antimicrobial and Antipathogenic Features. *Antibiotics*, *12*(2), 371. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020371>
- Ladan Moghadam, A. R. (2017). New compound from the aerial parts of *Achillea millefolium*. *International Journal of Food Properties*, *20*(9), 2041-2051. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1230747>
- Ahmadi-Dastgerdi, A., Ezzatpanah, H., Asgary, S., Dokhani, S., & Rahimi, E. (2017). Phytochemical, Antioxidant and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from Flowers and Leaves of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium*. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, *20*(2), 395-409. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2017.1280419>
- Marchyshyn, C. M., Budniak, L. I., & Ivasiuk, I. M. (2020). Doslidzhennia dublynykh rechovyn u travi ta bulbakh smykavtsia yistivnoho (chufy) (*Cyperus esculentus* L.) metodom VERKh [Investigation of tannins in herb and tubers of the yellow nutgrass (*Cyperus esculentus* L.) (chufa) by HPLC method]. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*, *13*(2), 225-229. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2020.2.207119>
- Jing, W., Xiaolan, C., Yu, C., Feng, Q., & Haifeng, Y. (2022). Pharmacological effects and mechanisms of tannic acid. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, *154*, 113561. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113561>
- Fraga-Corral, M., Otero, P., Cassani, L., Echave, J., Garcia-Oliveira, P., Carpena, M., Chamorro, F., Lourenço-Lopes, C., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2021). Traditional Applications of Tannin Rich Extracts Supported by Scientific Data: Chemical Composition, Bioavailability and Bioaccessibility. *Foods*, *10*(2), 251. <https://doi.org/10.3390/foods10020251>
- State Enterprise Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center of Medicines Quality. (2014). *Derzhavna Farmakopeia Ukrainy* [The State Pharmacopoeia of Ukraine (Vol. 3, 2nd ed.)]. Kharkiv: State Enterprise Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center of Medicines Quality. [in Ukrainian].
- State Enterprise Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center of Medicines Quality. (2015). *Derzhavna Farmakopeia Ukrainy* [The State Pharmacopoeia of Ukraine (Vol. 1, 2nd ed.)]. Kharkiv: State Enterprise Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center of Medicines Quality. [in Ukrainian].
- Nayeem, N., & SMB, A. (2016). Gallic Acid: A Promising Lead Molecule for Drug Development. *Journal of Applied Pharmacy*, *08*(02). <https://doi.org/10.4172/1920-4159.1000213>



Development of a method for the quantitative determination of glibenclamide in tablets

L. H. Leleka^{ID}*A,B,D, S. O. Vasiuk^{ID}C,E,F

Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine

A – research concept and design; B – collection and/or assembly of data; C – data analysis and interpretation; D – writing the article; E – critical revision of the article; F – final approval of the article

Aim. To develop and validate a spectrophotometric technique for quantitative determination of glibenclamide in tablets by reaction with 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone.

Materials and methods. In the study, the substance glibenclamide of pharmacopoeial purity was used, tablets – “Maninil” 5 mg and “Glibenclamid-Zdorovye” 5 mg, 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone of the “CFA” qualification was chosen as a reagent, as a solvent – dimethylformamide (DMF) “CFA”.

The following analytical equipment was used for the research: spectrophotometer “Specord-200” (Analytic Jena AG, Germany), water bath “MEMMERT WNB7”, laboratory electronic scales RADWAG XA 210. 4Y, measuring laboratory vessels of class A.

Results. A new, simple spectrophotometric method of quantitative determination of glibenclamide in tablets by reaction with 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone in DMF medium was developed. The absorption maximum was at 489–491 nm. The value of the detection limit is 10.9 µg/ml, which indicates sufficient sensitivity of the reaction.

Subordination to the basic law of light absorption is within the limits of concentrations of 13.7–27.4 mg/100 ml. In the process of developing the methodology, the following validation characteristics were determined: specificity, linearity, precision, correctness, and robustness.

Conclusions. The methodology for the quantitative determination of glibenclamide was developed and validated according to the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine. It has been proven that the method is simple, accessible, and validated for such characteristics as linearity, convergence and robustness and can be used for application in laboratories for quality control of medicinal products.

Key words: glibenclamide, 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone, spectrophotometry, validation study, quantitative determination, pharmaceutical preparations, substance, State Pharmacopoeia of Ukraine (SPU).

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(2), 135-140

Розробка методу кількісного визначення глібенкламіду в таблетках

Л. Г. Лелека, С. О. Васюк

Мета роботи – розробити та валідувати спектрофотометричну методику кількісного визначення глібенкламіду в таблетках за реакцією з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном.

Матеріали та методи. У дослідженні використали субстанцію глібенкламіду фармакопейної чистоти, таблетки – «Манініл» 5 мг і «Глібенкламід-Здоров'я» 5 мг, як реагент обрали 2,3-дихлор-1,4-нафтохінон кваліфікації «ч. д. а.», як розчинник – диметилформамід (ДМФА) «ч. д. а.».

Для дослідження застосували таке аналітичне обладнання: спектрофотометр «Specord-200» (Analytic Jena AG, Німеччина), водяна баня «MEMMERT WNB7», ваги лабораторні електронні RADWAG XA 210. 4Y, мірний лабораторний посуд класу А.

Результати. Розроблено нову, просту спектрофотометричну методику кількісного визначення глібенкламіду в таблетках за реакцією з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном у середовищі ДМФА. Максимум поглинання – при 489–491 нм. Значення межі виявлення становить 10,9 мкг/мл, що свідчить про достатню чутливість реакції.

Підпорядкування основному закону світлопоглинання перебуває у межах концентрацій 13,7–27,4 мг/100 мл. У процесі розроблення методики визначили такі валідаційні характеристики: специфічність, лінійність, прецизійність, правильність і робастність.

ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/274336>

UDC 543.062:615.252.349.7:615.453.6
DOI: 10.14739/2409-2932.2023.2.274336

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(2), 135-140

Key words: glibenclamide, 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone, spectrophotometry, validation study, quantitative determination, pharmaceutical preparations, substance, State Pharmacopoeia of Ukraine (SPU).

*E-mail: demyanova0610@gmail.com

Received: 04.04.2023 // Revised: 20.04.2023 // Accepted: 26.04.2023

Висновки. Розроблено та валідовано методику кількісного визначення глібенкламіду згідно з вимогами Державної Фармакопеї України. Доведено, що методика є простою та доступною, валідована за такими характеристиками, як лінійність, збіжність і робастність, може бути рекомендована до застосування в лабораторіях з контролю якості лікарських засобів.

Ключові слова: глібенкламід, 2,3-дихлор-1,4-нафтохінон, спектрофотометрія, валідація, кількісне визначення, лікарські засоби, субстанція, Державна Фармакопея України.

Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2023. Т. 16, № 2(42). С. 135-140

The problem of type 2 diabetes mellitus is getting bigger every year. According to WHO statistics, the number of diseases will reach the seventh cause of death in the world by 2030 [1]. With this in mind, the pharmaceutical market of hypoglycemic drugs is expanding. Therefore, the search for new, express, selective, and sensitive methods for the quantitative determination of hypoglycemic medications (M) plays an important role at all stages of quality control of finished pharmaceuticals (FP).

For the quantitative determination of the glibenclamide substance, SPU offers alkalimetric titration. 0.400 g of the substance is dissolved when heated in 1.00 ml of 96 % alcohol and titrated with a 0.1 M sodium hydroxide solution to a pink color, using 1.0 ml of phenolphthalein solution as an indicator [2].

Instrumental methods of analysis are most often used to determine glibenclamide as part of medications. Among them, chromatographic and spectrophotometric in the UV and visible range of the spectrum are mainly found. Most often, glibenclamide in tablets and biological fluids is determined by TLC with densitometry [3], high-performance thin-layer chromatography [4,5], liquid chromatography [6], reversed-phase liquid chromatography [7], tandem method of liquid chromatography with mass spectrometry [8], HPLC [9], OF-HPLC [10,11], combined methods of HPLC with spectrophotometry [12,13], spectrophotometric methods [14–16] and UV-visible spectroscopy [17].

A spectrophotometric method for the quantitative determination of glibenclamide by reacting it with 2,3-dichloro-5,6-disiano-1,4-benzochinoin in a buffer solution at pH 2.0 has been previously reported [15]. However, the method requires heating the reaction mixture at 40 °C for 35 minutes, which limits its efficiency. The authors managed to obtain quite high response sensitivity results, but the long heating of the reaction mixture makes this technique long-lasting.

Therefore, development of express, direct, selective, and sensitive spectrophotometric method of quantitative determination of glibenclamide in tablets, certainly, is a promising direction of improvement of quality control of pharmaceutical preparations.

Aim

To develop and validate a spectrophotometric technique for the quantitative determination of glibenclamide in tablets by reaction with 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone.

Materials and methods

All chemicals and reagents used were of analytical or pharmaceutical grade.

The following were used for the research: glibenclamide substance series G-0619012 (MI); tablets “Maninil” 5 mg (BERLIN-CHEMIE MENARINI, Germany) series 18001, “Glibenclamid-Zdorovyе” 5 mg (Pharmaceutical company “Zdorovyе”, Ukraine) series 51121. As a reagent and solvent, 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone and DMF.

Analytical equipment: spectrophotometer “Specord-200” (Analytic Jena AG, Germany), water bath “MEMMERT WNB7”, electronic laboratory scales RADWAG XA 210. 4Y electronic laboratory scales RADWAG XA 210. 4Y, measuring laboratory vessels of class A.

General method of determination of glibenclamide

Preparation of the comparative solution of glibenclamide (WRS). Dissolve 0.05150 g of glibenclamide substance in 25.00 ml of DMF in a volumetric flask. If necessary, use an ultrasonic bath. Then fill the flask up to the mark with the same solvent and mix well. Transfer 1.00 ml of the resulting glibenclamide solution to a 10.00 ml volumetric flask, add 1.00 ml of a 0.5 % solution of 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone, and heat the mixture in a water bath at 95 °C for 25 minutes. After the solution has cooled down, fill the flask up to the mark with a DMF solution.

Preparation of the compensation solution. Place 1.00 ml of a 0.5 % solution of 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone in DMF in a 10.00 ml volumetric flask. Heat the flask, fill it up to the mark with the DMF solution, and mix well.

Determination of glibenclamide in tablets

Forty tablets are weighed and ground in a mortar. The exact weight of the obtained tablet mass (“Maninil” 5 mg – 1.23222 g; “Glibenclamid-Zdorovyе” 5 mg – 0.99441 g) is placed in a 25.00 ml flask, dissolved, and brought to volume with DMF. The resulting solution is stirred and filtered. The first portions of the filtrate are discarded. From the following portion, 1.00 ml is taken and analyzed according to the proposed procedure. The content of glibenclamide is calculated using the generally accepted formula.

Results

It was experimentally established that glibenclamide reacts with some quinones in a DMF environment to form colored reaction products. The highest optical density value (*Fig. 1*) was observed when using 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone, which has an absorption maximum of 491 nm. Therefore, 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone was chosen as the reagent.

In the process of developing the technique, the optimal conditions for the course of the reaction between glibenclamide and 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone were established.

It was experimentally established that 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone interacts faster with glibenclamide at 95 °C.

Fig. 2 and 3 show that the maximum absorption is observed after 25 minutes of heating. Therefore, a heating time of 25 min was chosen for further tests. The detection limit under such conditions is 10.9 $\mu\text{g/ml}$.

The concentration of the reagent was determined experimentally by the maximum yield of the reaction product, that is, by the maximum optical density (Fig. 4). As can be seen

from Fig. 3, the maximum value of the optical density is observed at a reagent concentration of 0.5 % in a volume of 1.00 ml, so this concentration was chosen for further work.

The stability of the studied solutions was determined by measuring the optical density every 15 min for 1 h. It was established that the studied solutions are stable for at least 1 hour (Fig. 5).

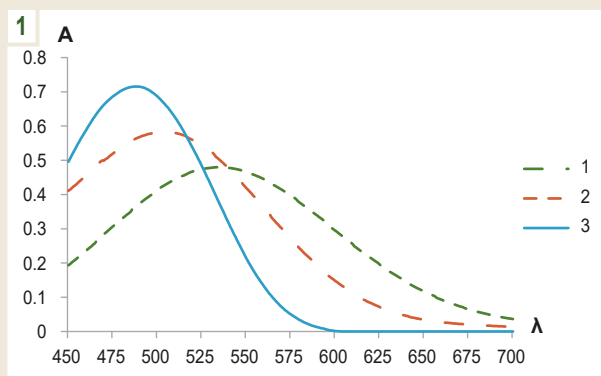


Fig. 1. Absorption spectra of the reaction products of glibenclamide with: 1) 2,5-dichloro-1,4-benzoquinone, 2) p-chloroanil, 3) 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone in DMF.

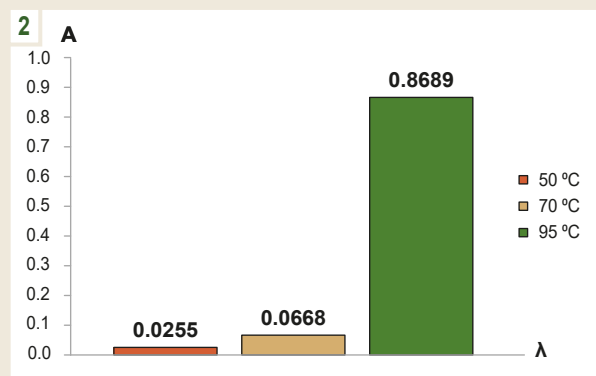


Fig. 2. Dependence of absorption of glibenclamide reaction products with 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone on the heating temperature of the reaction mixture.

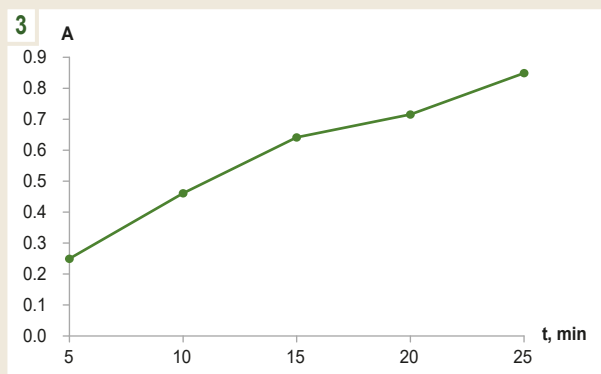


Fig. 3. Dependence of reaction product absorption on heating time.

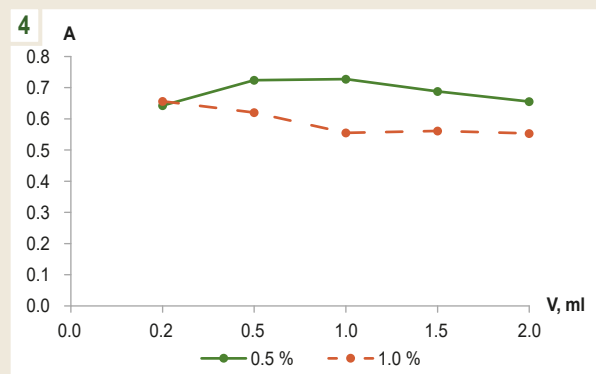


Fig. 4. Dependence of the absorption of the reaction product on the amount of added reagent.

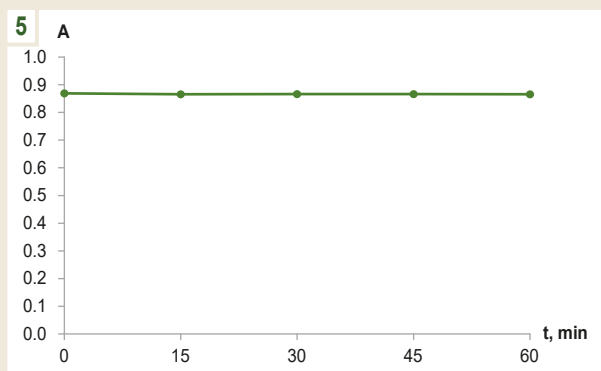


Fig. 5. Graph of the dependence of the reaction product of glibenclamide with 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone in DMF medium on time.

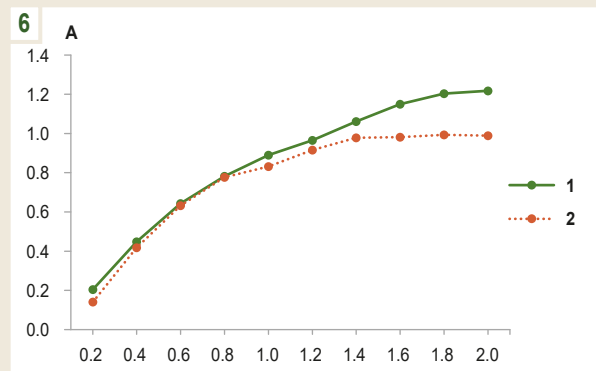


Fig. 6. Saturation curves: 1 – glibenclamide at a constant reagent concentration (1.00 ml of 0.005 M solution); 2 – 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone at a constant concentration of glibenclamide (1.00 ml of 0.005 M solution).

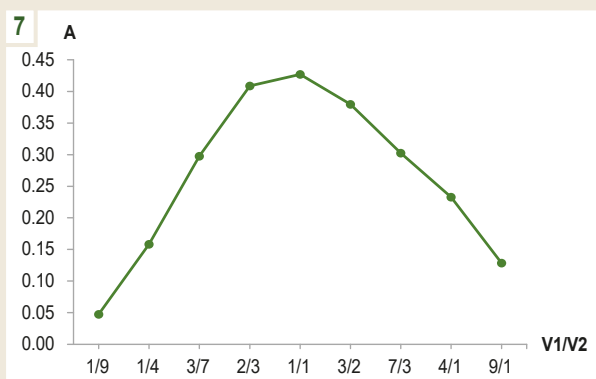


Fig. 7. Graph of dependence of absorption on the ratio of components of an isomolar solution. **V1:** volume of 0.005 M solution of 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone; **V2:** volume of 0.005 M solution of glibenclamide).

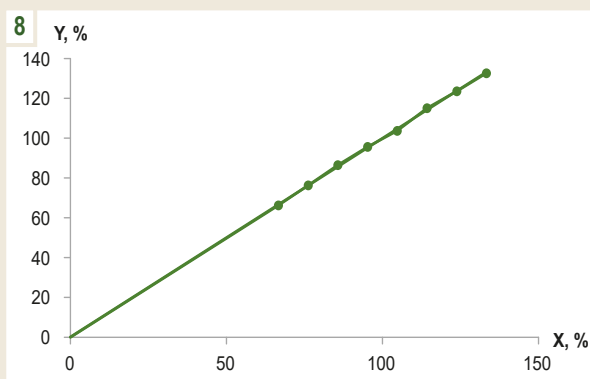


Fig. 8. Graph of absorption dependence on glibenclamide concentration (in normalized coordinates) at a wavelength of 491 nm.

Table 1. Numerical indicators of the linear dependence of the technique

Size	Value	Criteria	Conclusion
Equation of linear regression	$Y_i = bX_i + a$		
Correlation coefficient, r	0.99961	≥ 0.9631	meets
Residual standard deviation, $S_{x,0}$	0.7032	$\leq \Delta_{As} (\%) / t (95\%, 6)$ 0.8247	meets
Intercept term, $a \pm (Sa)$	$0.608 \pm (1.160)$	$\leq t (95\%, 6) \cdot Sa$ 2.245	meets
Slope, $b \pm (Sb)$	$0.994 \pm (0.0113)$	–	–

To determine the stoichiometric coefficients between glibenclamide and 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone, the method of continuous changes (method of isomolar series) and the method of molar ratios (method of saturation) were used. As can be seen from *Fig. 6* and *7*, glibenclamide interacts with the reagent in a ratio of 1:1.

Linearity. To determine the linearity, 9 absorption measurements of the comparison solution of glibenclamide were carried out in the range of concentrations in which subordination to Beer's law is observed, namely 13.7–27.4 mg/100 ml. The graph of the dependence of absorption on the concentration of glibenclamide in normalized coordinates is shown in *Fig. 8*.

The linearity of the proposed technique was evaluated using least squares regression analysis. The obtained values are given in the *Table 1*.

Precision. The precision of the proposed method for each dosage form was determined at the level of convergence. 9 parallel measurements were carried out. Three solutions were prepared from three measurements, each with three parallel measurements under optimal conditions. In parallel, the absorbance of the comparison solution was determined and the content of the substance under study was calculated. The obtained data are shown in the *Table 2*.

Correctness. To establish the correctness of the proposed methodology, the additive method was used. Different volumes of RSZ were added to three equal samples of the

Table 2. Determination of the convergence of the results of the quantitative determination of glibenclamide in tablets

Dosage form	$\bar{Z}\% (n = 9)$	$Sz\%$	ΔAs	$\Delta\%$	$\delta \leq \Delta\% / 3$
"Maninil" 5 mg	100.44	0.95	1.6	1.78	$0.44 \leq 0.59$
"Glibenclamid-Zdorovye" 5 mg	99.76	0.45	1.6	0.85	$0.24 \leq 0.28$

Table 3. Determination of the correctness of the results of the quantitative determination of glibenclamide in tablets

Dosage form	$\bar{Z}\% (n = 9)$	$Sz\%$	$\Delta\%$	$ 100 - \bar{Z} $	$\sigma \leq \Delta\% / 3$
"Maninil" 5 mg	100.23	0.57	1.06	0.23	$0.23 \leq 0.35$
"Glibenclamid-Zdorovye" 5 mg	99.79	0.69	1.29	0.21	$0.21 \leq 0.43$

medicinal substance and the optical density was determined three times. As can be seen in *Table 3*, the results of the determinations are correct, since the obtained results are included in the established confidence interval.

Complete uncertainty of the analytical technique

In order to confirm that the developed method will be correctly replicated in other laboratories, the total uncertainty of the reported method results has been calculated. According to the SPU, the total expected uncertainty in the technique is not expected to exceed the maximum allowable value of Δ_{As} .

Table 4. Calculation of the total uncertainty of the method of quantitative determination of glibenclamide

The operation of sample preparation	Calculation formula parameter	Uncertainty, %
The investigated solution		
Taking a measurement of the finished medicinal product	a_1	0.2 mg/994.4 mg × 100 % = 0.02 %
Bringing the volume up to the mark in a 25 ml volumetric flask	25	0.23
Taking an aliquot of the dilution of the finished medicinal product with a 1 ml pipette	1	0.74
Bringing the volume up to the mark in a 10 ml volumetric flask	10	0.50
Comparison solution		
Taking a dose of glibenclamide	a_0	0.2 mg/51.5 mg × 100 % = 0.39 %
Bringing the volume up to the mark in a 25 ml volumetric flask	25	0.23
Taking a 1 ml aliquot of gliclazide dilution with a pipette	1	0.74
Bringing the volume up to the mark in a 10 ml volumetric flask	10	0.50
$\Delta_{sp} = \sqrt{(0.02^2 + 0.23^2 + 0.74^2 + 0.50^2 + 0.39^2 + 0.23^2 + 0.74^2 + 0.50^2)} = 1.36 \%$		

The total uncertainty prediction was computed based on the formula (1):

$$\Delta_{As} = \sqrt{(\Delta_{sp}^2 + \Delta_{FAO}^2)} \quad (1)$$

where Δ_{sp} – is the uncertainty of sample preparation;
 Δ_{FAO} – is the predicted uncertainty of the final analytical operation.

It was taken into account that two solutions are used for the measurement procedure (comparison solution and test solution). When carrying out three parallel measurements with cuvette removal, the uncertainty value of the final analysis operation (Δ_{FAO}) will be equal to 0.70 % [18].

The calculation of the total uncertainty of the method is given in the Table 4. The calculations took into account the minimum weight of the finished medication.

Therefore, the total predicted uncertainty of the analysis (1.53 %) does not exceed the maximum permissible uncertainty of the method (3.20 %), which may be replicated in other laboratories [18].

Discussion

During the development of the method, optimal conditions were established for the reaction of glibenclamide with 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone, which involved heating for 25 minutes at a temperature of a boiling water bath in the DMF environment. Under these conditions, the methods for the quantitative determination of glibenclamide in tablets “Maninil” 5 mg and “Glibenclamid-Zdorovyie” 5 mg were developed, and validation characteristics such as linearity, precision, correctness, and sensitivity were determined. It has been demonstrated that the developed methods comply with the requirements of the SPU. The predicted total uncertainty of the technique suggests that it can be replicated in other laboratories.

Thus, after analyzing the literature on methods for analyzing glibenclamide in medical forms and biological objects, it can be asserted that the chromatographic methods presented

are very accurate and selective [3–7], but they require expensive equipment, lengthy preparation, and costly consumables. Some of these methods require other detection techniques to improve accuracy [12,13].

For spectrophotometric methods in the visible and UV spectrum, there is a need to optimize the conditions for increasing selectivity, such as by using derivatization reagents or changing the pH of the medium [14–16].

Despite the high sensitivity and selectivity of the reported methods, their cost and complexity remain a challenge. Therefore, the development of new, economical, and accessible methods for determining glibenclamide is still necessary.

Conclusions

1. As a result of the conducted research, a spectrophotometric method for the quantitative determination of glibenclamide was developed and validated.

2. The developed method is sensitive, easy to perform, available, and meets the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine, so it can be recommended for the analysis of glibenclamide in the laboratories of the technical quality control departments of pharmaceuticals.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.
Конфлікт інтересів: відсутній.

Information about authors:

Leleka L. H., Postgraduate student of the Department of Analytical Chemistry, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

ORCID ID: 0000-0002-3957-6264

Vasiuk S. O., PhD, DSc Professor, Head of the Department of Analytical Chemistry, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

ORCID ID: 0000-0002-1569-9374

Відомості про авторів:

Лелека Л. Г., аспірантка каф. аналітичної хімії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

Васюк С. О., д-р фарм. наук, професор, зав. каф. аналітичної хімії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

References

- [1] International Diabetes Federation. (2021). IDF Diabetes Atlas 10th ed. <https://diabetesatlas.org>
- [2] State Enterprise Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center of Medicines Quality. (2015). *Derzhavna Farmakopeya Ukrainy* [The State Pharmacopoeia of Ukraine (Vol. 1, 2nd ed.)]. Kharkiv: State Enterprise Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center of Medicines Quality. [in Ukrainian].
- [3] Andayani, R., Pitasari, F., & Rusdi. (2015). Development and validation of TLC densitometry method for simultaneous determination of metformin HCl and glibenclamide in tablets dosage form. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(9), 159-164.
- [4] Bhende, S. D., Varanasi, M. B., & Abbulu, K. (2020). A Sensitive HPTLC Method for the Estimation of Glibenclamide, Rosiglitazone Maleate and Metformin Hydrochloride from a Multicomponent Dosage Form. *Journal of chromatographic science*, 58(5), 418-426. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmz124>
- [5] Elkady, E. F., El-Zaher, A. A., Elwy, M. H., & Saleh, M. A. (2015). Validated Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Metformin, Pioglitazone, Sitagliptin, Repaglinide, Glibenclamide and Glucoside – Application for Counterfeit Drug Analysis. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, (S13). <https://doi.org/10.4172/2155-9872.s13-007>
- [6] Havele, S., & Dhaneshwar, S. (2014). Determination of glibenclamide, metformin hydrochloride and rosiglitazone maleate by reversed phase liquid chromatographic technique in tablet dosage form. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 20(1), 39-47. <https://doi.org/10.2298/ciceq120607101h>
- [7] Alam, M. A., Al-Jenoobi, F. I., & Al-Mohizea, A. M. (2018). Rapid, Validated UPLC-MS/MS Method for Determination of Glibenclamide in Rat Plasma. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2569027>
- [8] Zhang, Y. F., Liu, X. Q., Wang, Y., Xu, X., Zhong, M. K., Zhang, P., & Ma, C. L. (2021). Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of direct oral anticoagulants in human plasma. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 1182, 122952. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122952>
- [9] Confederat, L. G., Bujor, A., Condurache, I., Profire, L., Miron, A., & Bibire, N. (2021). Development and validation of a high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of glibenclamide and lipoic acid. *Farmacia*, 69(2), 246-252. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2021.2.8>
- [10] R. Tengli, A. (2013). Method Development and Validation of Metformin, Pioglitazone and Glibenclamide in Tablet Dosage Form by using RP-HPLC. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 02(02). <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000130>
- [11] Haq, N., Alanazi, F. K., Alsarra, I. A., & Shakeel, F. (2014). Rapid Analysis of Glibenclamide Using an Environmentally Benign Stability-Indicating RP-HPLC Method. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*, 13(3), 863-872.
- [12] Alhemiary, N. A. F. (2014). Derivative spectrophotometric and HPLC validated methods for simultaneous determination of metformin and glibenclamide in combined dosage form. *Oriental Journal of Chemistry*, 30(4), 1507-1516. <https://doi.org/10.13005/ojc/300408>
- [13] Porwal, P. K., & Talele, G. S. (2017). Development of validated HPLC-UV method for simultaneous determination of Metformin, Amlodipine, Glibenclamide and Atorvastatin in human plasma and application to protein binding studies. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 55(1), 129-139. <https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2016.10.002>
- [14] Sohrabi, M. R., Kamali, N., & Khakpour, M. (2011). Simultaneous spectrophotometric determination of metformin hydrochloride and glibenclamide in binary mixtures using combined discrete and continuous wavelet transforms. *Analytical sciences*, 27(10), 1037-1041. <https://doi.org/10.2116/analsci.27.1037>
- [15] Gloria, N., & Pius, U. (2018). Spectrophotometric and thermodynamic determination of glibenclamide using 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone. *Der pharma chemica*, 10(3), 9-15.
- [16] Antakli, S., Nejem, L., & Alraii, M. (2021). Determination of Glibenclamide By Analytical Spectrophotometry. *Journal of advances in chemistry*, 18, 40-48. <https://doi.org/10.24297/jac.v18i.8963>
- [17] Patil, S. S., & Bonde, C. G. (2009). Development and validation of analytical method for simultaneous estimation of glibenclamide and metformin HCl in bulk and tablets using UV – Visible spectroscopy. *International Journal of ChemTech Research*, 1(4), 905-909.
- [18] Grizodub, A. I. (2016). *Standartyzovani protsedury validatsii metodykh kontroliu yakosti likarskykh zasobiv* [Standardization of the procedure for validation of methods of quality control of drugs]. State Enterprise "Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Drug Quality". [in Ukrainian].



Обґрунтування оптимального складу та дослідження місцевого гемостатичного засобу на основі полісахаридів природного походження

В. В. Гладішев^{1,A,D}, С. І. Соколовський^{1B,2,B}, І. В. Собко^{1B,3,C}, Угіс Клетнієк^{1B,4,F}, Аудрюс Буткявічус^{1B,5,E}

¹Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна, ²ТОВ «Європейський медичний університет», м. Дніпро, Україна,

³Українська військово-медична академія, м. Київ, ⁴Латвійська асоціація довголіття, м. Юрмала, ⁵ГО «Міжнародний інформаційний Нобелівський центр. Офіційне представництво в Україні», м. Дніпро

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті; F – остаточне затвердження статті

Аналіз відомих засобів і методів припинення кровотеч свідчить, що ефективність медикаментозних засобів значно вища порівняно з механічними способами досягнення гемостазу, хоча не може повністю замінити хірургічний гемостаз у разі масивних кровотеч із крупних вен та, особливо, артерій. Як правило, під час бойових дій і при травмуванні на виробництві допомогу потрібно надати екстрено, тому перевагу мають місцеві гемостатики контактної дії.

Ці засоби не потребують особливих навичок під час застосування, тому потерпілий сам зможе надати собі допомогу при незначній травмі, якщо ці засоби є в аптечці, та вчасно зупинити кровотечу; у разі критичних кровотеч засіб може застосувати будь-яка людина, що перебуває поряд із постраждалим. Розроблення ефективних вітчизняних гемостатичних засобів – одне з вкрай актуальних завдань, зважаючи на ведення бойових дій на території України, для забезпечення такими продуктами наших військових.

Мета роботи – обґрунтування оптимального складу місцевого гемостатика на основі доступної сировини і технологій.

Матеріали та методи. Після ретельного аналізу вітчизняної та зарубіжної фахової літератури як основу майбутнього контактного гемостатичного засобу обрали адсорбуючі матеріали з біологічно активних компонентів мінерального, синтетичного, фіто- й органічного походження широкого спектра дії. Об'єкти цього дослідження – природні полісахариди з можливою гемостатичною активністю: альгінат, каппа карагінан, гуарова камедь, ксантанова камедь. Основною властивістю полісахаридів є здатність до набухання, що сприяє гемостазу. Кровоспинну дію модельних гемостатичних композицій вивчали на моделі кровотечі зі стенової артерії, що спричинена механічним пошкодженням. Застосували також модель капілярно-паренхіматозної кровотечі з різаною рани печінки в дорослих щурів.

Результати. Природні полісахариди характеризуються здатністю до водопоглинання та набухання, і тому їхня кровоспинна дія доведена експериментально та порівняно з відомими виробами медичного призначення Celox і Ревул®. Речовини з гемостатичною активністю альгінат, каппа карагінан GU 805 та препарат порівняння Celox вірогідно зменшують тривалість кровотечі щодо групи позитивного контролю (ПК) на 38 %, 53 % і 57 % відповідно. Для підвищення гемостатичної активності створено комбінацію сполук-лідерів із додаванням кальцію глюконату в дозі 7 %. Використання такої комбінації пов'язане з участю іонів кальцію в усіх етапах згортання крові, що підвищує гемостатичний ефект комбінації загалом. Згідно з результатами, що одержали, речовини з гемостатичною активністю альгінат, каппа карагінан GU 805 у комплексі з кальцію глюконатом, мірамістином і сумішшю фітокомпонентів, а також препарати порівняння Celox і Ревул® вірогідно зменшують тривалість кровотечі щодо показника групи ПК на 46 %, 47 %, 37 % і 36 % відповідно.

Висновки. Розроблено оптимальний склад контактної гемостатичної суміші – багатокомпонентного порошку на основі композиції природних сахаридів, комплексу антисептичних і ранозагоювальних речовин природного та синтетичного походження під умовною назвою Plantor, що забезпечує оптимальні консистентні, біофармацевтичні та фармакотехнологічні властивості. Виявили, що додавання до складу композиційного засобу 7 % кальцію глюконату сприяє оптимальному збільшенню рівня гемостатичної активності, що пов'язано з участю іонів кальцію в усіх етапах згортання крові. На кровоспинній моделі показано: запропонований склад фармакотерапевтичного засобу вірогідно зменшує тривалість кровотечі на 47 %, сумарно підвищує швидкість настання гемостазу; це ефективніше, ніж у разі застосування референтних гемостатиків місцевої дії.

Ключові слова: фармакотерапевтичні, лікарські засоби, природні полісахариди, гемостатична дія, кальцію глюконат, рослинні екстракти, ефірні олії.

Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2023. Т. 16, № 2(42). С. 141-146

ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/281238>

UDC 615.273'458.011/012.015.11/014
DOI: [10.14739/2409-2932.2023.2.281238](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2023.2.281238)

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(2), 141-146

Key words: pharmaceutical products, polysaccharides, hemostatic, calcium gluconate, plant extracts, essential oils.

*E-mail: gladishevuv@gmail.com

Received: 10.05.2023 // Revised: 26.05.2023 // Accepted: 07.06.2023

The justification of the optimal composition and research of a local hemostatic agent based on naturally occurring polysaccharides

V. V. Hladyshch, S. I. Sokolovskiy, I. V. Sobko, Ugis Kletnieks, Audrius Butkevichius

The analysis of existing methods and products for controlling bleeding reveals that medical means exhibit significantly higher efficacy compared to mechanical methods of achieving hemostasis. However, it is important to note that medical means cannot entirely replace surgical hemostasis in cases of severe bleeding from large veins and arteries. In emergency situations, such as during military conflicts or workplace injuries, the use of local contact hemostatic agents is preferred. These agents do not require specialized skills for application, making them accessible to individuals in need of immediate assistance. If included in a first-aid kit, these agents enable victims to address minor injuries promptly and control bleeding. In critical bleeding situations, any nearby individual can use the tool to provide aid. Given the ongoing military activities within our country's territory, the development of effective domestic hemostatic agents has become an urgent priority. This initiative aims to ensure the availability of such products to our military personnel.

Aim. The aim of this work is to justify the optimal composition of a local hemostatic agent based on readily available raw materials and feasible technologies.

Materials and methods. After conducting an extensive review of domestic and foreign literature, the basis for the development of the future contact hemostatic agent was chosen to be adsorbing materials derived from biologically active components of mineral, synthetic, phyto-, and organic origins.

The focus of this study is on natural polysaccharides with potential hemostatic activity, specifically alginate, kappa carrageenan, guar gum, and xanthan gum. One key property of polysaccharides is their ability to swell, which positively influences hemostasis. The hemostatic effect of model hemostatic compositions was evaluated using a femoral artery bleeding model induced by mechanical damage. Additionally, a model involving capillary-parenchymal bleeding from a laceration wound on the liver in adult rats was employed for further investigation.

Results. Experimental studies have provided evidence of the hemostatic effect of natural polysaccharides due to their water absorption and swelling properties. In comparison with well-known medical products Celox and Revul®, substances with hemostatic activity, including alginate, kappa carrageenan GU 805, and the comparative drug Celox, have demonstrated significant reductions in bleeding time. Specifically, alginate, kappa carrageenan GU 805, and Celox have shown reductions of 38 %, 53 %, and 57 % respectively, compared to the positive control (PC) group. To enhance the hemostatic activity, a combination of the leading compounds with the addition of 7 % calcium gluconate was developed. The inclusion of calcium gluconate in the combination is associated with the involvement of calcium ions in all stages of blood coagulation, thereby increasing the overall hemostatic effect of the combination.

Based on the obtained results, it can be concluded that substances with hemostatic activity, such as alginate, kappa carrageenan GU 805 in combination with calcium gluconate, miramistin, and a mixture of phytocomponents, as well as the comparative drugs Celox and Revul®, reliably reduce bleeding time by 46 %, 47 %, 37 %, and 36 %, respectively, in comparison to the PC group.

Conclusions. The optimal composition of a contact hemostatic agent, formulated as a multicomponent powder known as Plantor, has been developed. This composition is based on natural saccharides and incorporates a complex of antiseptic and wound-healing substances derived from natural and synthetic sources. The formulation of Plantor demonstrates optimal consistency, biopharmaceutical properties, and pharmacotechnological characteristics. The addition of 7 % calcium gluconate to the composition was found to effectively enhance the level of hemostatic activity. This enhancement is attributed to the involvement of calcium ions in all stages of blood coagulation. Experimental studies conducted using a hemostatic model have confirmed that the proposed composition of the pharmacotherapeutic agent significantly reduces bleeding time by 47 % and accelerates the overall process of hemostasis. The observed efficacy of the Plantor formulation surpasses that of reference local hemostatic agents, indicating its superior effectiveness in promoting hemostasis.

Key words: pharmaceutical products, polysaccharides, hemostatic, calcium gluconate, plant extracts, essential oils.

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(2), 141-146

Тривала кровотеча при надзвичайній ситуації, травмі, бойовій травмі – одна з основних причин загибелі, якій можна запобігти і в мирному житті, і під час бойових дій [1,2]. Для її тимчасового припинення запропонували численні способи та засоби.

Вірогідно ефективним вважають використання кровоспинного джгута / турнікету, компресійної пов'язки, тампонування рани, а також застосування контактних кровоспинних засобів. Однак жоден із них не є універсальним [3–6].

Аналіз відомих засобів і методів тимчасового припинення кровотечі свідчить: медикаментозні засоби (контактні гемостатики) не можуть повністю замінити остаточний хірургічний гемостаз, але є дуже ефективними (особливо в поєднанні з механічними способами досягнення гемостазу) під час надання екстреної медичної та медичної допомоги [7–9].

У зв'язку з російською агресією проти України проаналізували дані медичної експертизи поранених і причини смертності під час бойових дій. З'ясували, що одне з провідних місць належить масованим крововтратам [10–12].

Як правило, під час бойових дій і при травмуванні на виробництві допомогу потрібно надати екстрено, тому перевагу мають місцеві гемостатики контактної дії. Ці засоби не потребують особливих навичок під час застосування, тому потерпілий сам зможе надати собі допомогу при незначній травмі, якщо ці засоби є в аптечці, та вчасно зупинити кровотечу; у разі критичних кровотеч засіб може застосувати будь-яка людина, що перебуває поряд із постраждалим. Розроблення ефективних вітчизняних гемостатичних засобів – одне з актуальних завдань, зважаючи на ведення бойових дій на території України, для забезпечення такими продуктами наших військових.

Мета роботи

Обґрунтування оптимального складу місцевого гемостатика на основі доступної сировини і технологій.

Матеріали і методи дослідження

Після ретельного аналізу вітчизняної та зарубіжної фахової літератури як основу майбутнього контактного гемостатичного засобу обрали адсорбуючі матеріали з біологічно активних компонентів мінерального, синтетичного, фіто- й органічного походження широкого спектра дії [13–15].

Об'єкти цього дослідження – природні полісахариди з можливою гемостатичною активністю: альгінат, каппа карагінан, гуарова камедь, ксантанова камедь. Основною властивістю полісахаридів є здатність до набухання, що сприяє гемостазу.

Кровоспинну дію модельних гемостатичних композицій вивчали на моделі кровотечі зі стегнової артерії, що спричинена механічним пошкодженням. Застосували також модель капілярно-паренхіматозної кровотечі з різаної рани печінки в дорослих щурів. Експерименти здійснили на білих безпородних щурах-самцях. У досліді з пошкодженням стегнової артерії маса тіла щурів становила 180–200 г; для досліді на моделі кровотечі з різаної рани печінки відібрали тварин із масою тіла 250–280 г. У кожному експерименті щурів ділили на 6 груп по 7–8 особин. В першу групу залучили тварин, яких прооперували під загальною анестезією, забезпечивши доступ до стегнової артерії або печінки без їх пошкодження, – негативний контроль (НК). У другу групу залучили тварин із модельною патологією без нанесення досліджуваних речовин – позитивний контроль (ПК). До третьої, четвертої, п'ятої та шостої груп належали тварини, яким на пошкоджену поверхню наносили новий кровоспинний засіб або препарат порівняння з доведеною гемостатичною активністю. Як препарат порівняння використовували виріб медичного призначення – місцевої дії гемостатик Celox у формі гранульованого порошку виробництва Medtrade Products Ltd, Велика Британія [16].

Для наркотизації тварин застосували тіопентал натрію внутрішньоочеревинно. Для моделювання кровотечі при механічному пошкодженні стегнової артерії виконували розтин пахвинної частини тіла наркотизованого щура, попередньо цю поверхню депілювали. Артерію препарували, пунктували її стінку голкою для підшкірних ін'єкцій. Після травматизації ватним тампоном збирали кров із рани шляхом одноразового промокання. Саме з цього моменту у групі ПК починали відлік тривалості кровотечі й оцінювали крововтрату шляхом визначення маси крові, яку ввібрав бинт відомої маси. В інших групах, де застосовували досліджувані препарати та препарати порівняння, відлік починався з моменту нанесення препарату на рану, після цього визначали тривалість кровотечі та масу крові, що була втрачена. Доза речовин становила 170 мг/кг. Дози визначали, враховуючи мінімальну кіль-

кість в упаковці ВМП гемостатика Celox, що становить 2 г. Дозу для щурів перерахували, виходячи з дози для людини, за допомогою коефіцієнтів видової чутливості, що розраховані Ю. П. Риболовлевим. Для речовин, що вивчали, вона становила 170 мг/кг.

При відтворенні моделі різаної рани печінки щурам виконували лапаротомію поздовжнім розрізом по білій лінії живота, на печінці скальпелем з обмежувачем робили надріз завдовжки 8 мм, глибина – 3 мм; ватним тампоном очищували рану від крові, з цього моменту в групі ПК оцінювали тривалість кровотечі та крововтрату. В інших експериментальних групах відлік починали з моменту нанесення досліджуваних речовин у розрахованій дозі.

Через 2 години після пошкодження стегнової артерії або печінки у тварин визначали час згортання методом Альтгаузена.

Результати

При додаванні води полісахариди утворюють густі драгли, що майже нерозчинні у воді [17]. Вивчаючи здатність полісахаридів до набухання, використали співвідношення речовини в розчині 1:20. Шляхом порівняння висоти шару розчиненого полісахариду для наступного вивчення обрали чотири зразки, що мали найбільшу здатність поглинати рідину. З ними проведено фармакологічний скринінг на моделі артеріальної кровотечі зі стегнової артерії щурів (табл. 1).

Згідно з результатами, що одержали, речовини з гемостатичною активністю альгінат, каппа карагінан GU 805 і препарат порівняння Celox у формі гранульованого порошку (Medtrade Products Ltd, Велика Британія) достовірно зменшують тривалість кровотечі щодо групи ПК на 38 %, 53 % і 57 % відповідно.

Опрацювавши результати фармакологічного скринінгу, для наступного вивчення обрали дві речовини з найкращими показниками за часом припинення кровотечі: альгінат та каппа карагінан GU 805.

Щоб виключити можливість виникнення запалення під час застосування каппа карагінану й альгінату, на моделі кровотечі зі стегнової артерії застосували попередню методику, але після нанесення препарату та припинення кровотечі рану продезінфікували розчином фурациліну та зашили. До початку експерименту в тварин виміряли температуру тіла та контролювали виникнення головних ознак запалення: підвищення температури тіла, почервоіння місця розтину, набряку. Кожна експериментальна група складалася з 3 тварин, зіставних за масою тіла. Спостереження тривало 3 дні, результати виключили можливе виникнення запалення після застосування каппа карагінану GU 805 та альгінату в разі їх потрапляння до кровоносного русла. Препарат порівняння Celox, як і досліджувані речовини, запалення не спричиняв. Результати експерименту наведено у таблиці 2.

Відомо, що кровоспинні властивості мають речовини і природного, й синтетичного походження. Для посилення гемостатичного ефекту до сполук-лідерів додали кальцію глюконат у формі порошку. Композиції речовин,

Таблиця 1. Вплив одноразового застосування рослинних полісахаридів на показники кровотечі зі стегнової артерії у щурів (n = 7–8), M ± m

Група тварин	Тривалість кровотечі, с	Маса крові, г
Позитивний контроль	91,3 ± 11,1	0,90 ± 0,23
Гуарова камедь, 170 мг/кг	90,9 ± 17,1	0,97 ± 0,31
Альгінат, 170 мг/кг	56,9 ± 11,1*	0,68 ± 0,25
Ксантанова камедь, 170 мг/кг	83,8 ± 20,0	1,15 ± 0,35
Каппа карагінан GU 805, 170 мг/кг	42,9 ± 9,0*	0,31 ± 0,13*
Celoh, 170 мг/кг	39,0 ± 5,8*	0,39 ± 0,10

*: вірогідні відмінності щодо показника групи ПК, p < 0,05.

Таблиця 2. Вплив одноразового застосування місцевих гемостатиків на показники, що характеризують запальні процеси у щурів (n = 3), M ± m

Група тварин	t вихідна, °C	t через добу, °C	t через 2 доби, °C	t через 3 доби, °C	ШОЕ, мм
Негативний контроль	37,1 ± 0,1	37,2 ± 0,2	37,0 ± 0,2	37,3 ± 0,2	3,7 ± 0,7
Позитивний контроль	37,1 ± 0,1	37,0 ± 0,5	37,6 ± 0,2	37,8 ± 0,4	11,7 ± 4,3
Альгінат, 170 мг/кг	36,8 ± 0,1	36,4 ± 0,1	37,1 ± 0,3	37,7 ± 0,0	11,3 ± 5,8
Каппа карагінан GU 805, 170 мг/кг	37,0 ± 0,1	36,9 ± 0,3	37,1 ± 0,3	37,8 ± 0,2	7,7 ± 3,5
Celoh, 170 мг/кг	37,0 ± 0,2	37,8 ± 0,2	37,1 ± 0,4	37,4 ± 0,3	7,7 ± 0,3

Статистичні розрахунки здійснили за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA.

Таблиця 3. Вплив одноразового застосування місцевих гемостатиків на показники кровотечі з різаної рани печінки (n = 6), M ± m

Група тварин	Тривалість кровотечі, с	Маса крові, г	Час згортання крові, с
Позитивний контроль	153,5 ± 20,5	0,87 ± 0,30	112,8 ± 7,5
Каппа карагінан GU 805 + кальцію глюконат 3 %, 170 мг/кг	63,2 ± 26,4*	0,57 ± 0,36	108,7 ± 17,6
Каппа карагінан GU 805 + кальцію глюконат 5 %, 170 мг/кг	42,7 ± 15,1*	0,46 ± 0,21	103,3 ± 10,8
Каппа карагінан GU 805 + кальцію глюконат 7 %, 170 мг/кг	32,8 ± 4,5*	0,07 ± 0,04*	90,0 ± 18,1
Celoh, 170 мг/кг	36,7 ± 4,1*	0,07 ± 0,03*	131,7 ± 6,7

*: статистично значущі відмінності з показниками групи ПК, p < 0,05.

що посилюють ефект одна одної та не спричиняють виникнення нових побічних реакцій, сприяють істотному пришвидшенню припинення кровотечі, а це і є головною метою створення нових гемостатичних засобів.

Гемостатичну активність композицій випробовували на моделі капілярно-паренхіматозної кровотечі з різаної рани печінки.

Експериментальних тварин поділили на 5 груп по 6 щурів. Перша група – позитивний контроль; друга, третя, четверта групи сформовані залежно від застосованої концентрації кальцію глюконату – 3 %, 5 %, 7 %, що доданий до основних субстанцій; щури п'ятої групи отримували препарат порівняння Celoh. Результати експерименту наведено в таблиці 3.

Результати показали: всі проаналізовані зразки вірогідно зменшують тривалість кровотечі порівняно з групою ПК, але лише комбінація каппа карагінану GU 805 з кальцію глюконатом 7 % і препарат порівняння Celoh достовірно зменшують крововтрату та забезпечують найшвидше припинення кровотечі.

Результати визначення гемостатичної активності композицій альгінату з різними кількостями кальцію

глюконату порівняно з показниками при застосуванні Celoh наведено в таблиці 4.

На моделі артеріальної кровотечі зі стегнової артерії щурів оцінили ефективність оптимальних композицій, що визначили, ґрунтуючись на результатах попередніх досліджень, порівняно з відомими гемостатиками – препаратами Celoh (Medtrade Products Ltd, Велика Британія) і Ревул® (ТОВ «Юрія-Фарм», Україна).

Для посилення клінічної цінності препарату, враховуючи особливості лікування травм, що супроводжуються кровотечею, доцільним вважали додаткове введення біологічно активних речовин, які характеризуються антисептичною, репаративною та ранозагоювальною діями, до складу експериментальних композицій.

Мірамістин має синергічну дію на антибіотики й інші антимікробні засоби, знижуючи стійкість бактерій і грибів до них. Засіб стимулює місцеві імунні реакції в осередку шляхом посилення поглинальної та перетравлювальної активності фагоцитів. Мірамістин посилює регенераторні процеси та репаративну активність у рані, має виражену протизапальну дію, а також активізує процеси фібринолізу в осередку запалення [18].

Таблиця 4. Вплив одноразового застосування місцевих гемостатиків на показники кровотечі з різаної рани печінки (n = 7), M ± m

Група тварин	Тривалість кровотечі, с	Маса крові, г
Позитивний контроль	153,71 ± 15,53	0,32 ± 0,10
Альгінат + кальцію глюконат 3 %, 170 мг/кг	60,14 ± 6,35	0,36 ± 0,15
Альгінат + кальцію глюконат 5 %, 170 мг/кг	51,57 ± 13,68	0,27 ± 0,23
Альгінат + кальцію глюконат 7 %, 170 мг/кг	49,71 ± 10,39	0,16 ± 0,09*
Celox, 170 мг/кг	64,14 ± 13,22	0,28 ± 0,12

*: вірогідні відмінності з показниками групи ПК, p < 0,05.

Таблиця 5. Вплив одноразового застосування місцевих гемостатиків на показники кровотечі зі стегнової артерії в щурів (n = 8), M ± m

Група тварин	Тривалість кровотечі, с	Маса крові, г
Позитивний контроль	138,5 ± 13,76	2,45 ± 0,22
Альгінат + кальцію глюконат 7 %, 170 мг/кг	75,50 ± 13,54*	2,22 ± 0,28
Каппа карагінан GU 805 + кальцію глюконат 7 %, 170 мг/кг	73,50 ± 4,29*	1,81 ± 0,44
Celox, 170 мг/кг	87,00 ± 13,33*	2,44 ± 0,39
Ревул®, 170 мг/кг	88,38 ± 15,64*	1,82 ± 0,30

*: вірогідні відмінності з показниками групи ПК, p < 0,05.

Суміш рідких біостимульованих спиртових екстрактів ялівцю, багна з ефірними оліями чайного дерева, лаванди, ялиці, сосни, туї, шавлії, кедр, мирта, евкаліпта має виражену антибактеріальну, антимікотичну, антимікробну, протизапальну, регенерувальну й ранозагоювальну активності. Результати досліджень наведено в *таблиці 5*.

Обговорення

Природні полісахариди характеризуються здатністю до водопоглинання та набухання, і тому їхня кровоспинна дія доведена експериментально та порівняно з відомими виробами медичного призначення Celox і Ревул®. Речовини з гемостатичною активністю альгінат, каппа карагінан GU 805 і препарат порівняння Celox достовірно зменшують тривалість кровотечі щодо показника групи ПК на 38 %, 53 % і 57 % відповідно.

Для підвищення гемостатичної активності створено комбінацію сполук-лідерів із додаванням кальцію глюконату в дозі 7 %. Використання такої комбінації пов'язано з участю іонів кальцію в усіх етапах згортання крові, що підвищує гемостатичний ефект комбінації загалом.

Згідно з результатами, що одержали, речовини з гемостатичною активністю альгінат, каппа карагінан GU 805 у комплексі з кальцію глюконатом, мірамистином і сумішшю фітокомпонентів, а також препарати порівняння Celox і Ревул® вірогідно зменшують тривалість кровотечі щодо показника групи ПК на 46 %, 47 %, 37 % і 36 % відповідно.

Висновки

1. Розроблено оптимальний склад контактного гемостатичного засобу – багатокомпонентного порошку на основі композиції природних сахаридів, комплексу антисептичних і ранозагоювальних речовин природного та

синтетичного походження під умовною назвою Plantor, що забезпечує оптимальні консистентні, біофармацевтичні та фармакотехнологічні властивості.

2. Виявлено, що додавання до складу композиційного засобу 7 % сприяє оптимальному збільшенню рівня гемостатичної активності. Це пов'язано з участю іонів кальцію в усіх етапах згортання крові.

3. На кровоспинній моделі показано: запропонований склад фармакотерапевтичного засобу достовірно зменшує тривалість кровотечі на 47 % та сумарно підвищує швидкість настання гемостазу. Це свідчить про його вищу ефективність, ніж у разі застосування референтних гемостатиків місцевої дії.

Перспективи подальших досліджень полягають у продовженні доклінічних досліджень нового місцевого гемостатичного засобу під умовною назвою Plantor.

Фінансування

Робота виконана в рамках договору про співпрацю між Запорізьким державним медико-фармацевтичним університетом і ТОВ «Європейський медичний університет».

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Відомості про авторів:

Гладишев В. В., д-р фарм. наук, зав. каф. технологій ліків, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0001-5935-4856

Соколовський С. І., канд. мед. наук, доцент, проректор з міжнародних зав'язків ТОВ «Європейський медичний університет», м. Дніпро, Україна.

ORCID ID: 0000-0003-1491-5159

Собко І. В., канд. мед. наук, полковник медичної служби, доцент каф. військової хірургії, Українська військово-медична академія, м. Київ, Україна.

ORCID ID: 0009-0003-9177-0237

Угіс Клетнієкс, доктор MBA, член правління Центру компетентних технологій та розумних матеріалів, Латвійська асоціація довголіття, м. Юрмала.

ORCID ID: 0000-0002-5300-0974

Аудріус Буткявічус, MD, модератор проєктів з військової медицини, ГО «Міжнародний інформаційний Нобелівський центр. Офіційне представництво в Україні», м. Дніпро.

ORCID ID: 0009-0007-3243-7951

Information about authors:

Hladyshch V. V., PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Medicinal Preparations Technology, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

Sokolovskiy S. I., MD, PhD, Associate Professor, Vice-Rector for International Relations, Limited Liability Company "European Medical University", Dnipro, Ukraine.

Sobko I. V., MD, PhD, Colonel of the Medical Service, Associate Professor of the Department of Military Surgery, Military medical academy of Ukraine, Kyiv.

Ugis Kletnis, Doctor of MBA, Member of the Board of the Smart Materials and Technologies Competence Center, Latvian Longevity Association, Jurmala.

Audrius Butkevichius, MD, Moderator of Projects on Military Medicine, International Nobel Information Centre, Official Representation in Ukraine, Dnipro.

References

- Malik, A., Rehman, F. U., Shah, K. U., Naz, S. S., & Qaisar, S. (2021). Hemostatic strategies for uncontrolled bleeding: A comprehensive update. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 109(10), 1465-1477. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34806>
- Schauer, S. G., Naylor, J. F., Oliver, J. J., Maddry, J. K., & April, M. D. (2019). An analysis of casualties presenting to military emergency departments in Iraq and Afghanistan. *The American journal of emergency medicine*, 37(1), 94-99. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2018.04.068>
- Rass, V., & Helbok, R. (2021). How to diagnose delayed cerebral ischaemia and symptomatic vasospasm and prevent cerebral infarction in patients with subarachnoid haemorrhage. *Current opinion in critical care*, 27(2), 103-114. <https://doi.org/10.1097/MCC.0000000000000798>
- Teixeira, P. G. R., Brown, C. V. R., Emigh, B., Long, M., Foreman, M., Eastridge, B., Gale, S., Truitt, M. S., Dissanaik, S., Duane, T., Holcomb, J., Eastman, A., Regner, J., & Texas Tourniquet Study Group (2018). Civilian Prehospital Tourniquet Use Is Associated with Improved Survival in Patients with Peripheral Vascular Injury. *Journal of the American College of Surgeons*, 226(5), 769-776.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2018.01.047>
- Palmer, L. (2022). Hemorrhage control-Proper application of direct pressure, pressure dressings, and tourniquets for controlling acute life-threatening hemorrhage. *Journal of veterinary emergency and critical care*, 32(S1), 32-47. <https://doi.org/10.1111/vec.13116>
- Sung, Y. K., Lee, D. R., & Chung, D. J. (2021). Advances in the development of hemostatic biomaterials for medical application. *Biomaterials research*, 25(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s40824-021-00239-1>
- Lee, C., Rasmussen, T. E., Pape, H. -C., Gary, J. L., Stannard, J. P., & Haller, J. M. (2021). The polytrauma patient: Current concepts and evolving care. *OTA International: The Open Access Journal of Orthopaedic Trauma*, 4(2S), e108. <https://doi.org/10.1097/oi9.000000000000108>
- Wang, X. X., Liu, Q., Sui, J. X., Ramakrishna, S., Yu, M., Zhou, Y., Jiang, X. Y., & Long, Y. Z. (2019). Recent Advances in Hemostasis at the Nanoscale. *Advanced healthcare materials*, 8(23), e1900823. <https://doi.org/10.1002/adhm.201900823>
- Thompson, P., & Strandenes, G. (2019). The History of Fluid Resuscitation for Bleeding. In *Damage Control Resuscitation: Identification and Treatment of Life-Threatening Hemorrhage* (pp. 3-29). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20820-2_1
- Mazuchowski, E. L., Kotwal, R. S., Janak, J. C., Howard, J. T., Harcke, H. T., Montgomery, H. R., Butler, F. K., Holcomb, J. B., Eastridge, B. J., Gurney, J. M., & Shackelford, S. A. (2020). Mortality review of US Special Operations Command battle-injured fatalities. *The journal of trauma and acute care surgery*, 88(5), 686-695. <https://doi.org/10.1097/TA.0000000000002610>
- Kotwal, R. S., Scott, L. L. F., Janak, J. C., Tarpey, B. W., Howard, J. T., Mazuchowski, E. L., Butler, F. K., Shackelford, S. A., Gurney, J. M., & Stockinger, Z. T. (2018). The effect of prehospital transport time, injury severity, and blood transfusion on survival of US military casualties in Iraq. *The journal of trauma and acute care surgery*, 85(1S Suppl 2), S112-S121. <https://doi.org/10.1097/TA.0000000000001798>
- Howard, J. T., Kotwal, R. S., Stern, C. A., Janak, J. C., Mazuchowski, E. L., Butler, F. K., Stockinger, Z. T., Holcomb, B. R., Bono, R. C., & Smith, D. J. (2019). Use of Combat Casualty Care Data to Assess the US Military Trauma System During the Afghanistan and Iraq Conflicts, 2001-2017. *JAMA surgery*, 154(7), 600-608. <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2019.0151>
- Huang, L., Liu, G. L., Kaye, A. D., & Liu, H. (2020). Advances in Topical Hemostatic Agent Therapies: A Comprehensive Update. *Advances in therapy*, 37(10), 4132-4148. <https://doi.org/10.1007/s12325-020-01467-y>
- Hu, Z., Zhang, D. Y., Lu, S. T., Li, P. W., & Li, S. D. (2018). Chitosan-Based Composite Materials for Prospective Hemostatic Applications. *Marine drugs*, 16(8), 273. <https://doi.org/10.3390/md16080273>
- Li, X. F., Lu, P., Jia, H. R., Li, G., Zhu, B., Wang, X., & Wu, F. G. (2023). Emerging materials for hemostasis. *Coordination Chemistry Reviews*, 475, 214823. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2022.214823>
- Hatamabadi, H. R., Asayesh Zarchi, F., Kariman, H., Arhami Dolatabadi, A., Tabatabaey, A., & Amini, A. (2015). Celox-coated gauze for the treatment of civilian penetrating trauma: a randomized clinical trial. *Trauma monthly*, 20(1), e23862. <https://doi.org/10.5812/traumamon.23862>
- Grubnik, I. M., Nikolaychuk, N. O., & Gladukh, Ye. V. (2010). Vplyv tekhnolohichnykh parametriv na reolohichni vlastyivosti vodnykh rozchyniv hidrokoloidiv [The influence of technological parameters on rheological properties of water solutions of hydrocolloids]. *Visnyk farmatsii*, (4), 30-32. [in Ukrainian].
- Osmanov, A., Farooq, Z., Richardson, M. D., & Denning, D. W. (2020). The antiseptic Miramistin: a review of its comparative in vitro and clinical activity. *FEMS microbiology reviews*, 44(4), 399-417. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa012>



Синтез, молекулярний докінг та ADME аналіз ряду похідних 4-аміно-3,5-диметил-1,2,4-тріазолу

Л. І. Кучеренко^{А,С,Е,Ф}, Т. С. Британова^{В,С,Д,Е}, А. С. Гоцуля^{Д,Е}

Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна

А – концепція та дизайн дослідження; В – збір даних; С – аналіз та інтерпретація даних; Д – написання статті; Е – редагування статті; Ф – остаточне затвердження статті

Гетероциклічна система 1,2,4-тріазолу дає змогу успішно створювати перспективні біологічно активні сполуки. Створення на її основі ряду похідних 4-аміно-3,5-диметил-1,2,4-тріазолу дає змогу розширити спектр потенційних біологічно активних сполук.

Мета роботи – синтез та *in silico* обґрунтування перспективності пошуку біологічно активних сполук серед похідних 4-аміно-3,5-диметил-1,2,4-тріазолу.

Матеріали та методи. Під час роботи використали сучасні методи синтезу сполук органічної природи з наступним підтвердженням індивідуальності та структури синтезованих сполук за допомогою фізико-хімічних параметрів і спектральних методів (¹H ЯМР-, ІЧ-спектроскопія, елементний аналіз, хромато-мас-спектрометрія). Подібність синтезованих сполук до загальних властивостей лікарських засобів визначали за допомогою онлайн-інструмента SwissADME. Імовірність впливу на ряд ферментних систем (циклооксигеназа-2, ланостерол 14α-деметилаза, анапластичної лімфоми кіназа) оцінювали, використовуючи молекулярний докінг.

Результати. Одержали серію нових похідних 4-аміно-3,5-диметил-1,2,4-тріазолу, для яких оптимізовано умови синтезу та доведено будову. Встановили високу імовірність впливу на ланостерол 14α-деметилазу, що підкреслює актуальність наступного дослідження синтезованого ряду сполук на протигрибкову активність. Визначили також можливість впливу на активність циклооксигенази-2 та анапластичної лімфоми кіназу. Втім, імовірність виявлення відповідної активності, зокрема протизапальної та протиракової, є незначною. Фізичні показники, параметри фармакокінетики та лікоподібності мають значення, що свідчать про перспективність створення біологічно активних субстанцій на основі синтезованого ряду сполук.

Висновки. Синтезовано ряд 4-((R-іден)аміно)-3,5-диметил-1,2,4-тріазолів, для яких встановили загальні фізико-хімічні константи; *in silico* методами визначили загальний рівень перспективності щодо створення на їхній основі інноваційних біологічно активних субстанцій.

Ключові слова: 1,2,4-тріазол, синтез, молекулярний докінг, ADME-аналіз.

Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2023. Т. 16, № 2(42). С. 147-153

Synthesis, molecular docking, and ADME analysis of a series of 4-amino-3,5-dimethyl-1,2,4-triazole derivatives

L. I. Kucherenko, T. S. Brytanova, A. S. Hotsulia

The heterocyclic system of 1,2,4-triazole enables the successful creation of promising biologically active compounds. By creating a range of derivatives based on 4-amino-3,5-dimethyl-1,2,4-triazole, the spectrum of potential biologically active compounds can be expanded.

The aim of the work was the synthesis and *in silico* justification of the prospects for the search for biologically active compounds among 4-amino-3,5-dimethyl-1,2,4-triazole derivatives.

Materials and methods. The work uses modern methods for synthesizing organic compounds, followed by confirmation of their individuality and structure through the analysis of physical-chemical parameters and spectroscopic techniques such as ¹H NMR, IR spectroscopy, elemental analysis, and chromatography-mass spectrometry. To assess the similarity of the synthesized compounds to medicinal products, the SwissADME online tool was employed. The probability of impact on a number of enzyme systems (cyclooxygenase-2, lanosterol 14α-demethylase, anaplastic lymphoma kinase) was estimated using molecular docking.

Results. A series of newly synthesized derivatives of 4-amino-3,5-dimethyl-1,2,4-triazole was obtained, and the synthesis conditions were optimized and their structures were confirmed. It was determined that there is a high probability of influencing lanosterol 14α-demethylase, highlighting the significance of further research on the antifungal activity of the synthesized compounds. Additionally, the potential influence on the activity of cyclooxygenase-2 and anaplastic lymphoma kinase was discovered. However, the probability of exhibiting the correspond-

ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/281039>

UDC 547.792-304.2.057-12-047.58:615.31.015
DOI: [10.14739/2409-2932.2023.2.281039](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2023.2.281039)

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(2), 147-153

Key words: 1,2,4-triazole, synthesis, molecular docking, ADME analysis.

*E-mail: andrey_goculya@gmail.com

Received: 12.05.2023 // Revised: 05.06.2023 // Accepted: 13.06.2023

ing activities, namely anti-inflammatory and anti-cancer, is low. Physical indicators, parameters of pharmacokinetics, and drug-likeness are important, which determines the prospects of creating biologically active substances based on the synthesized series of compounds.

Conclusions. A series of 4-((R-iden)amino)-3,5-dimethyl-1,2,4-triazoles were synthesized, and their general physical-chemical properties were determined. The overall potential for creating innovative biological products based on these compounds was assessed using *in silico* methods for predicting the activity of substances.

Key words: 1,2,4-triazole, synthesis, molecular docking, ADME analysis.

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(2), 147-153

Сучасний фармацевтичний ринок України та інших країн світу з кожним роком значно розширюється [1]. Дослідження в галузі фармації та медицини показали: лікарські засоби, що містять ядро 1,2,4-тріазолу, характеризуються доволі широким спектром біологічної активності [2].

Напрями сучасної наукової роботи, що пов'язані з залученням названого синтону до структури нових перспективних сполук, є актуальними для багатьох наукових груп. Цьому сприяє багата історія в сфері створення триазоловмісних лікарських засобів [3]. Так, у чинних протоколах лікування наведено численні протигрибкові лікарські засоби, анксиолітики, гепато-, нейро- та кардіопротектори, протиракові, протимігренозні та інші засоби; ще більше подібних сполук перебуває на різних стадіях клінічних досліджень. Це підтверджує істотний потенціал названої гетероциклічної системи та її важливість під час створення сучасного лікарського засобу [4].

Крім визначення ролі самого гетероциклічного фрагмента в структурі біологічно активної сполуки, необхідно акцентувати на значенні фармакофорних груп та інших замісників, що безпосередньо пов'язані з системою 1,2,4-тріазолу і можуть певним чином змінювати активність триазоловмісної структури. Зауважимо також, що симетричне введення алкільних груп у триазольне кільце має важливий вплив на конформаційну стабільність ряду похідних 1,2,4-тріазолу, зберігаючи при цьому широкий спектр біологічних властивостей цільових продуктів хімічного перетворення [5]. Чимало уваги серед великої кількості актуальних трансформацій похідних цього азагетероциклу приділяють наявності аміногрупи як заміснику з широкими синтетичними та фармакологічними можливостями [6].

Отже, формування алгоритму досліджень, що пов'язаний із конструюванням алкіль- та амінопохідних 1,2,4-тріазолу, та втілення його на практиці, беззаперечно, має високу актуальність і важливе практичне значення [8].

Мета роботи

Синтез та *in silico* обґрунтування перспективності пошуку біологічно активних сполук серед похідних 4-аміно-3,5-диметил-1,2,4-тріазолу.

Матеріали і методи дослідження

Реалізація поставленої мети передбачала формування структури цільового ряду сполук за допомогою сучасних методів органічного синтезу.

Для підтвердження структури всіх синтезованих сполук використали сучасні фізико-хімічні методи аналізу.

Температуру плавлення визначали у відкритих капілярах, застосовуючи Stanford Research Systems Melting Point Apparatus 100 (SRS, USA). Аналіз відсоткового вмісту елементів (C, H, N) здійснили за допомогою аналізатора Elementar vario EL cube (Elementar Analysensysteme, Germany). Інфрачервона спектроскопія (спектральний діапазон 4000–400 см⁻¹) реалізована за допомогою спектрометра Bruker ALPHA FT-IR з використанням модуля ALPHA-T (Bruker optics, Germany). Спектри ¹H-ЯМР записано на спектрометрі Varian-Mercury 400 із застосуванням тетраметилсилану як внутрішнього стандарту в розчині ДМСО-*d*₆.

Індивідуальність синтезованих сполук, а також їхню структуру підтверджено з використанням хроматографа Agilent 1260 Infinity HPLC зі спектрометром Agilent 6120 (метод іонізації – електроспрей (ESI)).

Синтетичний етап роботи виконали, застосовавши реактиви компаній Sigma-Aldrich (Міссурі, США), Merck (Дармштадт, Німеччина) та Enamine (Київ, Україна).

Молекулярний докінг. Для визначення перспектив досліджень *in vitro* та *in vivo* здійснили докінгові дослідження. Як потенційні мішені для досліджень обрали фрагменти циклооксигенази-2 у комплексі з целекоксибром, ланостерол 14 α -диметилази в комплексі з флуконазолом та анапластичної лімфоми кінази в комплексі з кризотинібом.

Вибір біологічних мішеней обґрунтований відомостями фахової літератури щодо структурної схожості та можливого механізму дії [9,10].

Реалізація *in silico* досліджень передбачала виконання алгоритму:

1. робота з лігандом: формування структурних формул сполук за допомогою програми MarvinSketch 6.3.0 та їх збереження у mol-форматі; підготовка 3D-структури сполук – молекулярне моделювання (програма Hyper Chem 8 із використанням методу молекулярної механіки MM+, напівемпіричного квантово-механічного методу PM3 із максимальною кількістю циклів, Polak-Ribiere алгоритму й збереження у форматі *.pdb); перетворення *.pdb у *.pdbqt за допомогою програмного продукту AutoDockTools-1.5.6;

2. робота з ферментом: ліквідація молекул води та ліганду з файлу з використанням програмного пакету Discovery Studio 4.0, збереження ферменту в *.pdb; конвертування ферменту з *.pdb у *.pdbqt за допомогою AutoDockTools-1.5.6;

3. молекулярний докінг: використання програми Vina; створення візуальних об'єктів за допомогою програмного інструменту Discovery Studio 4.0.

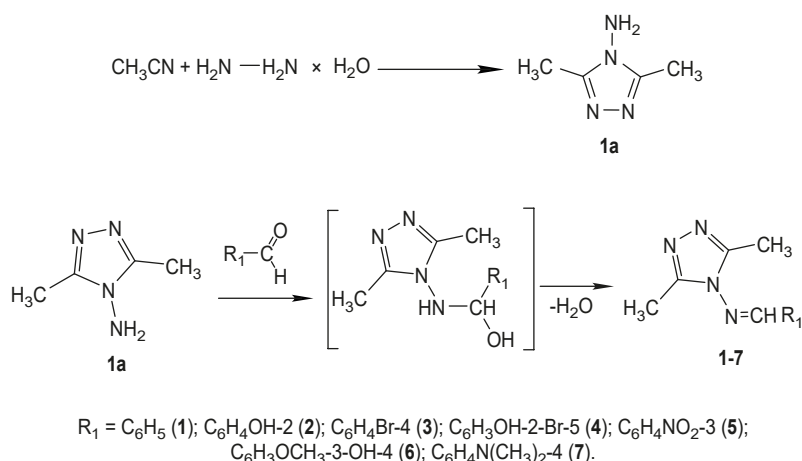


Рис. 1. Схема синтезу похідних 4-((R-іден)аміно)-3,5-диметил-1,2,4-тріазолу.

ADME аналіз. Для розрахунку основних параметрів фармакокінетики використали графічний інтерфейс вебсайту SwissADME [11,12]. Доступні дескриптори та молекулярні параметри розраховували відповідно до роз'яснень, що наведені у статті. Серед головних дескрипторів і параметрів, що визначено, – показник ліпофільності (Log P), площа полярних поверхонь молекул (TSPA), фракція sp^3 гібридних атомів Карбону, кількість обертових зв'язків, молярна рефракція. Вони безпосередньо пов'язані з найважливішими властивостями молекул: розміром, ліпофільністю, конформаційною рухливістю, здатністю до утворення водневих зв'язків.

Крім того, визначення TSPA дає змогу спрогнозувати адсорбцію, біодоступність і проникність через гемато-енцефалічний бар'єр. Для експрес-оцінювання лікоподібності застосували пелюсткові діаграми, що дають змогу враховувати параметри ліпофільності, розміру, полярності, розчинності, гнучкості.

Результати

Як вихідну речовину використали 4-аміно-3,5-диметил-1,2,4-тріазол (**1a**), який синтезовано шляхом взаємодії з ацетонітрилу та гідратованого гідразину в метанолі за методикою, що наведена в науковій літературі [7] (рис. 1).

Синтез похідних 4-аміно-3,5-диметил-N-бензиліден-1,2,4-тріазолу (1–7). До розчину 0,01 моль 4-аміно-3,5-диметил-1,2,4-тріазолу (**1a**) в 30 мл концентрованої кислоти етанової додавали 0,01 моль відповідного альдегіду (бензальдегід, 4-бромбензальдегід, 2-оксibenзальдегід, 4-метоксибензальдегід, 4-нітробензальдегід, 5-бром-2-оксibenзальдегід, 4-диметиламінобензальдегід).

Реакційну суміш залишали за кімнатної температури на 12–24 години. Утворені осаді сполук відфільтровували, промивали діетиловим ефіром і висушували (рис. 1).

Хімічна функціоналізація вихідного 4-аміно-3,5-диметил-1,2,4-тріазолу відбувалась шляхом взаємодії з похідними бензальдегіду (бензальдегідом, 2-гідроксибензальдегідом, 4-бромбензальдегідом, 3-ні-

тробензальдегідом, 2-гідрокси-5-бромбензальдегідом, 3-метокси-4-гідроксибензальдегідом, 4-диметиламіно-бензальдегідом) у середовищі кислоти етанової за кімнатної температури протягом 12 годин без додаткового залучення каталізатора.

Одержані в такий спосіб похідні 4-((R-іден)аміно)-3,5-диметил-1,2,4-тріазолу – білі (**1–4, 6, 7**) або жовті (**5**) кристалічні речовини, важкорозчинні у воді, розчинні в органічних розчинниках.

4-Бензиламіно-3,5-диметил-1,2,4-тріазол (1). $T_{\text{пл.}} = 49–51$ °C. $^1\text{H NMR}$, δ (м.ч.): 7.76–7.64 (д, 2H, H-2,6, C_6H_5), 7.35 (т, $J = 3.8$ Hz, 1H, H-4, C_6H_5), 7.23 (т, $J = 3.8$ Hz, 2H, H-3,5, C_6H_5), 6.35 (т, $J = 3.8$ Hz, 1H, $\text{NH}-\text{CH}_2$), 4.37 (д, 2H, $\text{NH}-\text{CH}_2$), 2.25 (с, 6H, 2 CH_3). Обчислено (%) для $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_4$: C – 65.98, H – 6.04, N – 27.98; знайдено (%): C – 66.17, H – 6.03, N – 28.07. ESI-MS: $m/z = 203$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Кристалізовано з етанолу.

2-(((3,5-Диметил-1,2,4-тріазол-4-іл)аміно)метил)фенол (2). Вихід – 90 %. $T_{\text{пл.}} = 219–221$ °C. $^1\text{H NMR}$, δ (м.ч.): 12.36 (с, 2- $\text{OH}-\text{C}_6\text{H}_4$), 7.23 (дд, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-6, 2- $\text{OH}-\text{C}_6\text{H}_4$), 7.11 (т, $J = 7.8$, 1H, H-4, 2- $\text{OH}-\text{C}_6\text{H}_4$), 6.87 (т, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-5, 2- $\text{OH}-\text{C}_6\text{H}_4$), 6.72 (дд, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-3, 2- $\text{OH}-\text{C}_6\text{H}_4$), 6.32 (т, $J = 3.8$ Hz, 1H, $\text{NH}-\text{CH}_2$), 4.56 (дд, $J = 4.1$ Hz, 2H). Обчислено (%) для $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}$: C – 61.18, H – 5.59, N – 25.91; знайдено (%): C – 60.93, H – 5.59, N – 25.81. ESI-MS: $m/z = 219$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Кристалізовано з етанолу.

1-(4-Бромфеніл-N-3,5-диметил-1,2,4-тріазол-4-іл)метанімін (3). Вихід – 51 %. $T_{\text{пл.}} = 167–169$ °C. $^1\text{H NMR}$, δ (м.ч.): 7.45–7.40 (м, 2H, H-3,5, 4-Br- C_6H_4), 7.33–7.27 (м, 2H, H-2,6, 4-Br- C_6H_4), 6.35 (т, $J = 3.8$ Hz, 1H, $\text{NH}-\text{CH}_2$), 4.41 (д, 2H, $\text{NH}-\text{CH}_2$), 2.27 (с, 6H, 2 CH_3). Обчислено (%) для $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{BrN}_4$: C – 61.18, H – 5.59, N – 25.91; знайдено (%): C – 60.93, H – 5.59, N – 25.81. ESI-MS: $m/z = 282$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Кристалізовано з етанолу.

4-Бromo-2-(((3,5-диметил-1,2,4-тріазол-4-іл)іміно)метил)фенол (4). Вихід – 69 %. $T_{\text{пл.}} = 138–140$ °C. $^1\text{H NMR}$, δ (м.ч.): 7.78 (с, 1H, 2- $\text{OH}-5-\text{Br}-\text{C}_6\text{H}_3$), 7.41–7.36 (м, 1H, H-6, 2- $\text{OH}-5-\text{Br}-\text{C}_6\text{H}_3$), 7.12 (дд, $J = 8.0, 2.3$ Hz, 1H, H-4,

2-OH-5-Br-C₆H₃), 6.92 (д, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-3, 2-OH-5-Br-C₆H₃), 6.34 (т, $J = 4.2$ Hz, 1H, NH-CH₂), 4.49 (д, $J = 4.1$ Hz, 2H, NH-CH₂), 2.27 (с, 6H, 2CH₃). Обчислено (%) для C₁₁H₁₁BrN₄O: C – 44.77, H – 3.76, N – 18.98; знайдено (%): C – 44.66, H – 3.76, N – 19.00. ESI-MS: $m/z = 298$ [M+H]⁺. Кристалізовано з етанолу.

N-(3,5-диметил-1,2,4-тріазол-4-іл)-1-(4-нітрофенілметанімін) (5). Вихід: 54 %. $T_{\text{пл.}} = 226\text{--}228$ °C. ¹H NMR, δ (м. ч.): 8.20 – 8.14 (м, 2H, H-2,4, 3-NO₂-C₆H₄), 7.59 – 7.54 (м, 2H, H-5,6, 3-NO₂-C₆H₄), 6.45 (т, $J = 3.9$ Hz, 1H, NH-CH₂), 4.50 (д, 2H, NH-CH₂), 2.26 (с, 6H, 2CH₃). Обчислено (%) для C₁₁H₁₁N₅O₂: C – 53.87, H – 4.52, N – 28.56; знайдено (%): C – 53.72, H – 4.49, N – 28.66. ESI-MS: $m/z = 248$ [M+H]⁺. Кристалізовано з етанолу.

5-(((3,5-Диметил-1,2,4-тріазол-4-іл)іміно)метил)-2-метокси-фенол (6). Вихід: 77 %. $T_{\text{пл.}} = 222\text{--}224$ °C. ¹H NMR, δ (м. ч.): 6.92 – 6.87 (м, 1H, H-6, 3-OCH₃-4-OH-C₆H₃), 6.81 – 6.77 (м, 1H, H-2, 3-OCH₃-4-OH-C₆H₃), 6.72 (д, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-5, 3-OCH₃-4-OH-C₆H₃), 6.64 (с, 1H, 3-OCH₃-4-OH-C₆H₃), 6.42 (т, $J = 4.2$ Hz, 1H, NH-CH₂), 4.48 (д, $J = 4.1$ Hz, 2H, NH-CH₂), 3.85 (с, 3H, 3-OCH₃-4-OH-C₆H₃), 2.26 (с, 6H, 2CH₃). Обчислено (%) для C₁₂H₁₄N₄O₂: C – 58.53, H – 5.73, N – 22.75; знайдено (%): C – 58.33, H – 5.37, N – 22.78. ESI-MS: $m/z = 249$ [M+H]⁺. Кристалізовано з етанолу.

3-(((3,5-Диметил-1,2,4-тріазол-4-іл)іміно)метил)-N,N-диметиланілін (7). Вихід: 68 %. $T_{\text{пл.}} = 104\text{--}106$ °C. ¹H NMR, δ (м. ч.): 7.22 (дд, $J = 7.9, 0.9$ Hz, 2H, H-2,6, 4-(CH₃)₂N-C₆H₄), 6.62 – 6.56 (м, 2H, 2H, H-3,5, 4-(CH₃)₂N-C₆H₄), 6.35 (т, $J = 3.8$ Hz, 1H, NH-CH₂), 4.39 (дд, $J = 3.9, 0.9$ Hz, 2H, NH-CH₂), 2.92 (с, 4H, 4-(CH₃)₂N-C₆H₄), 2.26 (с, 6H, 2CH₃). Обчислено (%) для C₁₃H₁₇N₅: C – 64.17, H – 7.04, N – 28.78; знайдено (%): C – 64.00, H – 7.00, N – 28.88. ESI-MS: $m/z = 298$ [M+H]⁺. Кристалізовано з етанолу.

Фенільний замісник і його заміщення сприяють появі очікуваних сигналів, що фіксуються в «ароматичній» області спектра ¹H ЯМР. Наприклад, протони в орто-положенні фенільного замісника сполуки **1** резонують як дублет в інтервалі 7,76–7,64 м. ч., протони у мета-положенні спричиняють появу триплету при 7,23 м. ч., а протон у пара-положенні зумовлює формування триплету при 7,35 м. ч. Азотметиленовий фрагмент цієї сполуки спричиняє появу при 6,35 м. ч. триплету (NH-CH₂) та дублету при 4,37 м. ч. (NH-CH₂). У сильній частині магнітного поля спектра сполуки **1** з'являється шестипротонний синглет при 2,25 м. ч.; це підтверджує наявність у структурі речовини двох метильних груп.

Поява замісників у фенільному фрагменті по-різному впливає на диференціацію протонних сигналів. Так, в ароматичній області спектра ¹H ЯМР сполуки **2** спостерігали утворення дублету дублетів при 7,23 м. ч. та при 6,72 м. ч., триплетів – при 7,11 м. ч. та при 6,87 м. ч. Сигнали підтверджують наявність у структурі речовини 2-гідроксифенільного замісника.

Сигнали протонів 4-бромфенільного фрагмента сполуки **3** легко визначають як двопротонні мультиплети: орто-протонам належить хімічний зсув при 7,33–7,27 м. ч., мета-протонам – при 7,45–7,40 м. ч.

Протон в орто-положенні 2-гідрокси-5-бромфенільного замісника сполуки **4** утворює мультиплет в інтервалі 7,41–7,36 м. ч., протони в мета- та пара-положеннях спричиняють появу сигналів як дублету та дублету дублетів, що зареєстрували при 7,12 м. ч. та 6,92 м. ч.

Перехід до 3-нітрофенільного замісника (сполука **5**) призводить до зміщення сигналів протонів у слабше поле: фіксують два двопротонні мультиплети при 8.20–8.14 м. ч. та 7.59–7.54 м. ч.

У разі 3-метокси-4-гідроксифенільного замісника в спектрі спостерігали формування трьох піків: двох мультиплетів при 6.92–6.87 м. ч. і 6.81–6.77 м.ч. з однопротонною інтенсивністю сигналу кожний, а також дублету при 6,72 м. ч.

Спектр сполуки **7** характеризується в ароматичній зоні дублет-дублетним сигналом при 7,22 м. ч. і мультиплетним сигналом при 6,62–6,56 м. ч., за появу яких відповідає пара-диметиламінофенільний замісник.

Перший етап дослідження пов'язаний із визначенням природи взаємодій одержаних лігандів з активним центром циклооксигенази-2. Так, докінг 4-бензиламіно-3,5-диметил-1,2,4-тріазолу (**1**) до активного сайту циклооксигенази-2 дав змогу виявити такі типи взаємодій:

1. алкіл (за участю залишків ALA A: 528, VAL A: 350 з метильним замісником 1,2,4-тріазолового фрагмента);
2. π -алкіл (за участю залишків ALA A: 528, LEU A: 353 та π -хімічного зв'язку 1,2,4-тріазолового циклу);
3. π - σ (за участю залишку VAL A: 524 та π -хімічного зв'язку фенільного фрагмента);
4. π -амід стекингова взаємодія (GLY A: 527 та π -хімічного зв'язку 1,2,4-тріазолового фрагмента).

Мінімальна енергія комплексоутворення цієї речовини з активним сайтом циклооксигенази-2 становила -7,0 ккал/моль (целекоксид – -13,4 ккал/моль).

Поява за фенільним фрагментом синтезованих молекул полярних замісників не призводила до істотних змін у природі амінокислотних залишків контактного активного центру цього ферменту. Однак дещо трансформувалась природа взаємодій.

Так, докінг 2-(((3,5-диметил-1,2,4-тріазол-4-іл)аміно)метил)фенолу (**2**) до активного сайту циклооксигенази-2 дав змогу встановити такі типи взаємодій:

1. алкіл (за участю залишків ALA A: 528, LEU A: 124, PRO A: 529 з метильним замісником 1,2,4-тріазолового фрагмента);
2. π -алкіл (за участю залишків VAL A: 117 і π -хімічного зв'язку 2-гідроксифенільного фрагмента, PRO A: 529 та π -хімічного зв'язку 1,2,4-тріазолового циклу);
3. π - σ (за участю залишків ALA A: 528, ARG A: 121 та 1,2,4-тріазолового фрагмента, VAL A: 89 і π -хімічного зв'язку 2-гідроксифенільного фрагмента);
4. Карбон-Гідроген взаємодія (GLU A: 525 з лінкерним метиленовим фрагментом азотметиленової групи).

Мінімальна енергія комплексоутворення цієї речовини з активним сайтом циклооксигенази-2 становила -6,4 ккал/моль.

Докінг 4-(4-бромобензиламіно)-3,5-диметил-1,2,4-тріазолу (**3**) показав подібне до попередніх лігандів поведжен-

ня в активному центрі циклооксигенази-2 та дав змогу зафіксувати такі взаємодії:

1. алкіл (за участю залишку LEU A: 353, TYR A: 349, TYR A: 386, VAL A: 350 з метильним замісником 1,2,4-тріазолового фрагмента);

2. π -алкіл (за участю залишків ALA A: 528, VAL A: 524 та π -хімічного зв'язку 4-бромофенільного фрагмента, LEU A: 353 та π -хімічного зв'язку 1,2,4-тріазолового фрагмента);

3. π - π стекинг (за участю залишку PHE A: 519 та π -хімічного зв'язку 1,2,4-тріазолового фрагмента).

Мінімальна енергія комплексоутворення цієї речовини з активним сайтом циклооксигенази-2 становила -7,0 ккал/моль.

3-поміж усіх синтезованих речовин найбільш перспективним як майбутній кандидат щодо дослідження протизапальної активності визначили 4-(3-нітробензиламіно)-3,5-диметил-1,2,4-тріазол (5). Це підтверджено збільшеною кількістю хімічних контактів:

1. алкіл (за участю залишків MET A: 523, PHE A: 519, TRP A: 388 із метильним замісником 1,2,4-тріазолового фрагмента);

2. π -алкіл (за участю залишку LEU A: 353 та π -хімічного зв'язку 1,2,4-тріазолового фрагмента);

3. π -амід стекинг (за участю залишку GLY A: 5273 і π -хімічного зв'язку 1,2,4-тріазолового фрагмента);

4. π - σ (за участю залишків SER A: 354, VAL A: 524 і π -хімічного зв'язку 3-нітрофенільного фрагмента);

5. Карбон-Гідроген взаємодія (за участю залишків ARG A: 514, HIS A: 90 з 3-нітрофенільним фрагментом);

6. міжмолекулярний водневий хімічний зв'язок (за участю залишку SER A: 531 із першим або другим атомом Нітрогену 1,2,4-тріазолового фрагмента);

7. сили ван дер Ваальсової взаємодії (за участю залишків ALA A: 528).

Мінімальна енергія комплексоутворення цієї речовини з активним сайтом циклооксигенази-2 становила -8,0 ккал/моль.

Наступні кроки щодо встановлення перспективного напрямку біологічних досліджень пов'язані з дослідженням комплексів синтезованих лігандів із ланостерол 14 α -деметилазою. Візуалізація докінгу 4-бензиламіно-3,5-диметил-1,2,4-тріазолу (1) дала змогу встановити взаємодії:

1. алкіл (за участю залишку ALA A: 256 та CYS A: 394 з метильним замісником 1,2,4-тріазолового фрагмента);

2. π -алкіл (за участю залишків ALA A: 256, ALA A: 400, CYS A: 394 і π -хімічного зв'язку 1,2,4-тріазолового циклу, залишків ALA A: 104, ALA A: 256, LEU A: 100, LEU A: 152 та π -хімічного зв'язку фенільного фрагмента);

3. π - σ (за участю залишку LEU A: 105 та π -хімічного зв'язку фенільного фрагмента);

4. π - π Т-стекинг (за участю залишків PHE A: 399 і π -хімічного зв'язку фенільного фрагмента).

Мінімальна енергія комплексоутворення цієї речовини з активним сайтом ланостерол-14 α -деметилази становила -6,7 ккал/моль (для кетоконазолу цей показник дорівнює -10,1 ккал/моль).

Перехід до 2-((3,5-диметил-1,2,4-тріазол-4-іл)аміно)метил)фенолу (2) підвищує імовірність впливу на ланостерол 14 α -деметилазу, що виявляється формуванням ширшого спектра взаємодій:

1. π -алкіл (за участю залишку CYS A: 394 з π -електронною системою 1,2,4-тріазолового фрагмента);

2. π - σ (за участю залишків LEU A: 321 та π -хімічного зв'язку 1,2,4-тріазолового циклу);

3. π - π стекинг (за участю залишку TYR A: 76 та π -хімічного зв'язку 2-гідроксифенільного фрагмента);

4. π - π Т-стекинг (за участю залишків PHE A: 387 та π -хімічного зв'язку 1,2,4-тріазолового синтону);

5. ван дер Ваальсова взаємодія (GLY A: 388).

Мінімальна енергія комплексоутворення цієї речовини з активним сайтом ланостерол 14 α -деметилази становила -6,4 ккал/моль.

Перспективи щодо взаємодії з ланостерол 14 α -деметилазою має 4-(4-бромобензиламіно)-3,5-диметил-1,2,4-тріазол (3), що підтверджено природою зв'язків і їхньою кількістю:

1. алкіл (за участю залишків ALA A: 256, LEU A: 100 із метильним замісником 1,2,4-тріазолового фрагмента);

2. π -алкіл (за участю залишку ALA A: 256 з π -електронною системою 1,2,4-тріазолового фрагмента);

3. π - σ (за участю залишків LEU A: 321 та π -хімічного зв'язку 4-бромофенільного фрагмента);

4. π - π Т-стекинг (за участю залишку TYR A: 76 та π -хімічного зв'язку 4-бромофенільного фрагмента);

5. π -катионна взаємодія (ARG A: 96 та 1,2,4-тріазоловим синтоном).

Мінімальна енергія комплексоутворення цієї речовини з активним сайтом ланостерол 14 α -деметилази становила -6,5 ккал/моль.

Безперечним лідером можливого впливу на ланостерол 14 α -деметилазу виявився 4-(3-нітробензиламіно)-3,5-диметил-1,2,4-тріазол (5). Це підтверджено значним різноманіттям взаємодій:

1. алкіл (за участю залишків LEU A: 321, LEU A: 324 з метильним замісником 1,2,4-тріазолового фрагмента);

2. π -алкіл (за участю залишків ALA A: 400, CYS A: 394, PRO A: 320 і π -хімічного зв'язку 3-нітрофенільного фрагмента, LEU A: 324, CYS A: 394 та π -хімічного зв'язку 1,2,4-тріазолового фрагмента);

3. π -амід стекинг (за участю залишків ARG A: 393, PHE A: 387 та π -хімічного зв'язку 1,2,4-тріазолового фрагмента);

4. π - σ (за участю залишків LEU A: 321 і π -хімічного зв'язку 1,2,4-тріазолового фрагмента);

5. міжмолекулярний водневий хімічний зв'язок (за участю залишків CYS A: 394, THR A: 260 з атомами Оксигену нітрогрупи);

6. сили ван дер Ваальсової взаємодії (за участю залишків GLY A: 388, SER A: 261).

Мінімальна енергія комплексоутворення цієї речовини з активним сайтом ланостерол-14 α -деметилази становила -7,1 ккал/моль.

Наступне дослідження пов'язане з аналізом можливої взаємодії з кіназою анапластичної лімфони. Так, 4-бен-

зиламіно-3,5-диметил-1,2,4-тріазол (**1**) показав обмежені можливості щодо утворення хімічних зв'язків з аміно-кислотними фрагментами активного сайту, з-поміж них зазначимо:

1. алкіл (за участю залишку LEU A: 1256 і метильного замісника при 1,2,4-тріазоловому фрагменті);
2. π -алкіл (за участю залишку ALAA: 1148 і π -хімічного зв'язку 1,2,4-тріазолового циклу);
3. π - σ (за участю залишку LEU A: 1256 і π -хімічного зв'язку 1,2,4-тріазолового циклу).

Мінімальна енергія комплексоутворення цієї речовини з активним сайтом анапластичної лімфоми кінази становила -6,1 ккал/моль.

Перехід 2-(((3,5-диметил-1,2,4-тріазол-4-іл)аміно)метил)фенолу (**2**) не призводить до значущих змін. Це підтверджено такими взаємодіями:

1. алкіл (за участю залишку LEU A: 1122 та LEU A: 1256 із метильним замісником 1,2,4-тріазолового фрагмента);
2. π -алкіл (за участю залишку ALAA: 1148 та π -хімічного зв'язку 1,2,4-тріазолового циклу, залишку LEU A: 1256 і π -хімічного зв'язку 2-гідроксифенільного фрагмента);
3. π - σ (за участю залишку LEU A: 1256 і π -хімічного зв'язку 1,2,4-тріазолового циклу).

Мінімальна енергія комплексоутворення цієї речовини з активним сайтом анапластичної лімфоми кінази становила -6,1 ккал/моль.

Подібну тенденцію спостерігали в разі появи галогенового замісника в фенільному фрагменті. Так, візуалізація докінгу 4-(4-бромобензиламіно)-3,5-диметил-1,2,4-тріазолу (**3**) до активного сайту цього ферменту дала змогу визначити такі типи взаємодій:

1. алкіл (за участю залишків LEU A: 1122 із метильним замісником 1,2,4-тріазолового фрагмента);
2. π -алкіл (за участю залишків ALAA: 1148, LEU A: 1122, LEU A: 1256 та π -хімічного зв'язку 1,2,4-тріазолового циклу, VALA: 1130 та π -хімічного зв'язку 4-бромфенільного фрагмента);
3. Карбон-Гідроген взаємодія (LEU A: 1122 із лінкерним метиленовим фрагментом азометиленової групи).

Мінімальна енергія комплексоутворення цієї речовини з активним сайтом анапластичної лімфоми кінази становила -6,1 ккал/моль.

Незначне поліпшення в природі взаємодій з активним сайтом кінази анапластичної лімфоми спостерігали в разі докінгу 4-(3-нітробензиламіно)-3,5-диметил-1,2,4-тріазолу (**5**). Зафіксували такі взаємодії:

- 1) алкіл (за участю залишків LEU A: 321, LEU A: 324 із метильним замісником 1,2,4-тріазолового фрагмента);
- 2) π -алкіл (за участю залишків ALA A: 400, CYS A: 394, PRO A: 320 та π -хімічного зв'язку 3-нітрофенільного фрагмента, LEU A: 324, CYS A: 394 та π -хімічного зв'язку 1,2,4-тріазолового фрагмента);
- 3) міжмолекулярний водневий хімічний зв'язок (за участю залишків CYS A: 394, THR A: 260 з атомами Оксигену нітрогрупи);
- 4) сили ван дер Ваальсової взаємодії (за участю залишків GLY A: 388, SER A: 261).

Мінімальна енергія комплексоутворення цієї речовини з активним сайтом анапластичної лімфоми кінази становила -6,4 ккал/моль.

Згідно з результатами прогнозування віртуальної бібліотеки сполук за ADME-аналізом, всмоктування передбачено на основі властивостей розчинності у воді, ліпофільності та відсотка кишкового всмоктування людини (HIA). Розчинність у воді передбачена за допомогою дескриптора Silicos IT Log S на основі платформи SwissADME. Значення Log S для досліджуваних сполук – в діапазоні від -2,81 до -4,27, що підтверджує їхню розчинність. Ліпофільність оцінювали за допомогою логарифма коефіцієнта розподілу *n*-октанол/вода ($\text{Log } P_{\text{oct/w}}$), який сильно пов'язаний із проникністю сполук. Хороша пероральна біодоступність (хороша проникність і розчинність) визначається інтервалом значень $\text{Log } P_{\text{oct/w}}$ від 0 до 3, який фактично є середнім арифметичним із п'яти прогнозованих значень (XLOGP3, WLOGP, MLOGP, SILICOS-IT). Для досліджуваних сполук прогнозовані значення $\text{Log } P_{\text{oct/w}}$ формують інтервал від 1,29 до 2,29; це свідчить, що сполуки 1–7 мають досить позитивний профіль ліпофільності.

Правило п'яти Ліпінського стверджує, що достатній рівень всмоктування біологічно активної молекули більш імовірний, коли молекулярна маса (MW) становить менше ніж 500 г/моль. Цей показник для сполук, що вивчали, дорівнює 200,24–279,14 г/моль, а отже їм властиве хороше поглинання або проникнення (*табл. 1*).

Кількість акцепторів Н-зв'язку (HBAs) має становити 10 і менше; для досліджуваних сполук – 3–5, а отже відповідає допустимим значенням.

Кількість донорів Н-зв'язку (HBDs) повинна становити 5 і менше; для сполук, що вивчали, – у межах 0–1.

Площа топологічної поверхні (TPSA) має бути <140 Å². Синтезовані сполуки набувають значень в інтервалі від 43 Å² до 88 Å²; це свідчить про відповідність структур за цим критерієм.

Зауважимо, що сполуки **1**, **2**, **3**, **4** і **5** мають необхідний ступінь насиченості молекул, що визначається часткою sp^3 -гібридних атомів Карбону на рівні 0,18. Для сполуки **6** цей показник становить 0,25, для **7** – 0,31, що відповідає необхідному.

Щодо лікоподібності, то за фільтрами Lipinski (Pfizer), Ghose (Amgen), Veber (GlaxoSmithKline), Egan (Pharmacia) та Muegge (Bayer) сполуки мали незначні порушення правила Ліпінського за чотирима критеріями. За критеріями біодоступності всі сполуки мають результат 0,55 од., що вказує на 10 % біодоступності при пероральному застосуванні. Зазначимо, що онлайн експрес-скринінг критеріїв лікоподібності з використанням радару біодоступності SwissADME в повній мірі відбиває відповідність за такими показниками, як ліпофільність (LIPO), розмір (SIZE), полярність (POLAR), розчинність (INSOLU), насиченість (INSATU) і гнучкість (FLEX).

Обговорення

Серед значного різноманіття хімічних зв'язків, що утворюють синтезовані ліганди з активними сайтами, зазначимо

Таблиця 1. Відповідність похідних 4-((R-іден)-аміно)-3,5-диметил-1,2,4-тріазолу за критеріями правила Ліпінського

Сполука	Log P _{oct/w}	MW, г/моль	HBA's	HBD's	TPSA, Å ²
1	2,06	200,24	3	0	43,07
2	1,66	216,24	4	1	63,30
3	2,06	279,14	3	0	43,07
4	2,29	295,14	4	1	63,30
5	1,29	245,24	5	0	88,89
6	1,60	246,27	5	1	72,53
7	2,02	243,31	3	0	46,31

переважання контактів гідрофобної природи за участю аліфатичних, ароматичних і гетероциклічних фрагментів. Найбільше хімічних зв'язків утворюється з активним сайтом ланостерол 14 α -деметилази, незначно менше – з циклооксигеназою-2, менше зв'язків формується щодо анапластичної лімфоми кінази.

За низкою фізичних властивостей, показниками фармакокінетики та лікоподібності синтезовані сполуки є зручним об'єктом для створення перспективної лікарської субстанції.

Отже, результати *in silico* досліджень дали змогу визначити 4-((R-іден)аміно)-3,5-диметил-1,2,4-тріазолу як актуальний і практично значущий ряд сполук.

Висновки

1. Синтезовано сім 4-((R-іден)аміно)-3,5-диметил-1,2,4-тріазолів, будову яких доведено сучасними методами аналізу.

2. За допомогою молекулярного докінгу визначили здатність сполук цього ряду впливати на ланостерол 14 α -деметилазу, циклооксигеназу-2 та кіназу анапластичної лімфоми.

3. З використанням ADME-аналізу встановили відповідність необхідним фізичним властивостям, показникам фармакокінетики та критеріям лікоподібності. Це підтверджує широкі перспективи в напрямі створення біологічно активних субстанцій на основі 4-((R-іден)аміно)-3,5-диметил-1,2,4-тріазолів.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Information about authors:

Kucherenko L. I., PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Pharmaceutical, Organic and Bioorganic Chemistry, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

ORCID ID: 0000-0003-2229-0232

Brytanova T. S., PhD, Teaching Assistant, Department of Pharmaceutical, Organic and Bioorganic Chemistry, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

ORCID ID: 0000-0003-1805-4552

Hotsulia A. S., PhD, DSc, Associate Professor of the Department of Natural Sciences for Foreign Students and Toxicological Chemistry, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

ORCID ID: 0000-0001-9696-221X

Відомості про авторів:

Кучеренко Л. І., д-р фарм. наук, професор, зав. каф. фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

Британова Т. С., канд. фарм. наук, асистент каф. фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

Гоцуля А. С., д-р фарм. наук, доцент каф. природничих дисциплін для іноземних студентів та токсикологічної хімії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

References

- [1] Singhal, N., Sharma, P. K., Dudhe, R., & Kumar, N. (2011). Recent advancement of triazole derivatives and their biological significance. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 3(2), 126-133.
- [2] Zhou, C. -H., & Wang, Y. (2012). Recent Researches in Triazole Compounds as Medicinal Drugs. *Current Medicinal Chemistry*, 19(2), 239-280. <https://doi.org/10.2174/092986712803414213>
- [3] Wajda-Hermanowicz, K., Pieniazczak, D., Zatajska, A., Wróbel, R., Drabent, K., & Ciunik, Z. (2015). A study on the condensation reaction of 4-amino-3,5-dimethyl-1,2,4-triazole with benzaldehydes: Structure and spectroscopic properties of some new stable hemiaminals. *Molecules*, 20(9), 17109-17131. <https://doi.org/10.3390/molecules200917109>
- [4] Jaman, Z., Karim, M. R., Dumenyo, K., & Mirza, A. H. (2014). Antibacterial Activities of New Schiff Bases and Intermediate Silyl Compounds Synthesized from 5-Substituted-1,10-phenanthroline- 2,9-dialdehyde. *Advances in Microbiology*, 04(15), 1140-1153. <https://doi.org/10.4236/aim.2014.415124>
- [5] Aggarwal, R., & Sumran, G. (2020). An insight on medicinal attributes of 1,2,4-triazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 205. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112652>
- [6] Hu, G., Wang, G., Duan, N., Wen, X., Cao, T., Xie, S., & Huang, W. (2012). Design, synthesis and antitumor activities of fluoroquinolone C-3 heterocycles (IV): s-triazole Schiff-Mannich bases derived from ofloxacin. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2(3), 312-317. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2011.11.003>
- [7] Cheng, L., Zhang, W. X., Ye, B. H., Lin, J. B., & Chen, X. M. (2007). In situ solvothermal generation of 1,2,4-triazolates and related compounds from organonitrile and hydrazine hydrate: A mechanism study. *Inorganic Chemistry*, 46(4), 1135-1143. <https://doi.org/10.1021/ic061303i>
- [8] Wu, B. D., Bi, Y. G., Zhou, M. R., Zhang, T. L., Yang, L., Zhou, Z. N., & Zhang, J. G. (2014). Stable high-nitrogen energetic trinuclear compounds based on 4-amino-3, 5-dimethyl-1, 2, 4-triazole: Synthesis, structures, thermal and explosive properties. *Zeitschrift Fur Anorganische Und Allgemeine Chemie*, 640(7), 1467-1473. <https://doi.org/10.1002/zaac.201300446>
- [9] Karpun, Y., Fedotov, S., & Khilkovets, A. An *in silico* investigation of 1,2,4-triazole derivatives as potential antioxidant agents using molecular docking, MD simulations, MM-PBSA free energy calculations and ADME predictions. *Pharmacia*, 2023, 70(1), 139-153. <https://doi.org/10.3897/pharmacia.70.e90783>
- [10] Fedotov, S., Gotsulya, A., Zaika, Ye., & Brytanova, T. (2023). Design, synthesis and molecular docking of some derivatives of 9-methylpyrazolo[1,5-d][1,2,4]triazolo [3,4-f][1,2,4]triazine-3-thiol. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 47(2), 336-348. <https://doi.org/10.33483/jfpau.1180794>
- [11] Bocci, G., Carosati, E., Vayer, P., Arrault, A., Lozano, S., & Cruciani, G. (2017). ADME-Space: A new tool for medicinal chemists to explore ADME properties. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06692-0>
- [12] Swiss Institute of Bioinformatics. (2023). *SwissADME*. <http://swissadme.ch/index.php#>



Визначення молекулярних механізмів розвитку та перебігу експериментального цукрового діабету в щурів лінії Вістар

Т. В. Іваненко *

Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна

Розвиток і прогресування діабету включає кілька молекулярних механізмів: інсулінорезистентність, дисфункцію бета-клітин, запальні процеси (їх виникнення спричинене впливом цитокінів і хемокинів, що порушують сигнальні шляхи інсуліну та зумовлюють апоптоз бета-клітин), генетичні фактори (деякі форми діабету спричинені генетичними мутаціями, що впливають на вироблення інсуліну або його чутливість). Молекулярні механізми виникнення та перебігу цукрового діабету складні, включають різні аспекти фізіології та біохімії організму. Розуміння цих механізмів має вирішальне значення для розроблення ефективних методів лікування та профілактики діабету.

Мета роботи – аналіз експресії генів, пов'язаних із діабетом, у зразках тканин підшлункової залози щурів лінії Вістар.

Матеріали та методи. Для аналізу експресії генів використовували метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу за допомогою набору RTI Profiler™ PCR Array Rat Diabetes (QIAGEN, Німеччина), де об'єктом дослідження в експериментальних тварин була підшлункова залоза.

Результати. RTI Profiler™ PCR Array Rat Diabetes профілює експресію 84 генів, пов'язаних із виникненням, розвитком і прогресуванням діабету. Панель містить гени, що спричиняють ожиріння, резистентність до інсуліну, ранній початок діабету та його пізні ускладнення. Ці гени представлені функціональними категоріями: рецепторами, транспортерами та каналами; ядерними рецепторами; метаболічними ферментами; факторами секреції; білками передачі сигналу; факторами транскрипції.

У результаті ПЛР-дослідження матеріалу тварин з експериментальним цукровим діабетом встановили активність генів *Nkx2-1*, *Pik3r1*, *Slc14a2* з високою експресією порівняно з контрольною групою щурів.

Висновки. Ген *Nkx2-1* асоційований із виникненням цукрового діабету. Виявили високу активність його експресії порівняно з інтактною групою тварин. Білок *Pik3r1* має високий рівень експресії у групі тварин з експериментальним цукровим діабетом. Ці зміни пов'язані з компенсаторним механізмом, що передбачає збереження клітинного потенціалу ендокринного апарату підшлункової залози. Підвищення рівня експресії білка *SLC14A2*, що виявили, імовірно, свідчить про початок розвитку пізніх ускладнень перебігу цукрового діабету, які пов'язані з патологією нирок.

Ключові слова: щури лінії Wistar, підшлункова залоза, гени *Nkx2-1*, *Pik3r1*, *Slc14a2*.

Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2023. Т. 16, № 2(42). С. 154-157

Determination of molecular mechanisms of development and course of experimental diabetes mellitus in Wistar rats

T. V. Ivanenko

The development and progression of diabetes involves several molecular mechanisms, in particular: insulin resistance, dysfunction of beta cells, inflammatory processes. These mechanisms can disrupt insulin signaling pathways, contribute to beta-cell apoptosis, and are not necessarily dependent on the intervention of cytokines and chemokines. Additionally, genetics play a role, as some forms of diabetes are caused by genetic mutations affecting insulin production or sensitivity. The molecular mechanisms underlying the development and progression of diabetes are complex and encompass various aspects of the body's physiology and biochemistry. Understanding these mechanisms is crucial for the development of effective methods for treating and preventing diabetes.

The aim of the work is analysis of the expression of genes, related to diabetes in pancreatic tissue samples of Wistar rats.

Materials and methods. The polymerase chain reaction method with real-time reverse transcription was used to analyze gene expression using the RTI Profiler™ PCR Array Rat Diabetes kit (QIAGEN, Germany), where the pancreas was the object of research in experimental animals.

Results. RTI Profiler™ PCR Array Rat Diabetes profiles the expression of 84 genes, associated with the onset, development, and progression of diabetes. The panel contains genes that contribute to obesity, insulin resistance, early-onset diabetes, and its late complications. These genes are represented by functional categories: receptors, transporters, and channels; nuclear receptors; metabolic enzymes; secretion factors; signal transduction proteins; transcription factors.

ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/281209>

UDC 616.379-008.64-018.1-092.9
DOI: [10.14739/2409-2932.2023.2.281209](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2023.2.281209)

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(2), 154-157

Key words: Wistar rats, pancreas, genes *Nkx2-1*, *Pik3r1*, *Slc14a2*.

*E-mail: ivanenko.tv@zsmu.zp.ua

Received: 18.05.2023 // Revised: 30.05.2023 // Accepted: 09.06.2023

According to the PCR results of the study of the control group of animals and animals with experimental diabetes, we established the activity of the *Nkx2-1* genes; *Pik3r1*; *Slc14a2* with high expression compared to control animals.

Conclusions. The *Nkx2-1* gene has been implicated in the pathogenesis of diabetes, as evidenced by its high expression activity compared to the control group of animals. Additionally, the *Pik3r1* protein shows elevated expression levels in the group of animals with experimental diabetes. These changes are believed to be part of a compensatory mechanism aimed at preserving the cellular function of the pancreatic endocrine system. Furthermore, the observed increase in *Slc14a2* protein expression likely indicates the onset of late complications associated with kidney pathology in the course of diabetes.

Key words: Wistar rats, pancreas, genes *Nkx2-1*, *Pik3r1*, *Slc14a2*.

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(2), 154-157

Цукровий діабет – метаболічний розлад, що характеризується високим рівнем цукру в крові через нездатність організму виробляти або належним чином використовувати інсулін. Розвиток і прогресування діабету включає кілька молекулярних механізмів: інсулінорезистентність, дисфункцію бета-клітин, запальні процеси (їх виникнення спричинене впливом цитокінів і хемокінів, що порушують сигнальні шляхи інсуліну та зумовлюють апоптоз бета-клітин), генетичні фактори (деякі форми діабету спричинені генетичними мутаціями, що впливають на вироблення інсуліну або його чутливість). Молекулярні механізми виникнення та перебігу цукрового діабету складні, включають різні аспекти фізіології та біохімії організму. Розуміння цих механізмів має вирішальне значення для розроблення ефективних методів лікування та профілактики діабету.

RTI Profiler™ PCR Array Rat Diabetes – науковий інструмент, що дає змогу одночасно аналізувати експресію сфокусованої панелі генів, пов'язаних із діабетом, у зразках тканин підшлункової залози щурів. Масив використовує зворотну транскрипцію та технологію полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі для вимірювання рівнів експресії генів, пов'язаних з діабетом, включаючи гени, що беруть участь у передачі сигналів інсуліну, метаболізмі глюкози та функції бета-клітин підшлункової залози. Використовуючи RTI Profiler™ PCR Array Rat Diabetes, можна вивчати молекулярні механізми, що лежать в основі діабету в щурів, ідентифікувати потенційні біомаркери захворювання та оцінити вплив медикаментозних і немедикаментозних втручань на експресію генів. Цей масив можна використовувати для вивчення моделей ожиріння та діабету, для скринінгу терапевтичних засобів і їхніх мішеней, а також для оцінювання ефекту різних епідеміологічних факторів і чинників довкілля на експресію генів у різних тканинах або клітинних лініях.

Мета роботи

Аналіз експресії генів, пов'язаних із діабетом, у зразках тканин підшлункової залози щурів лінії Вістар.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження здійснили на 10 білих щурах лінії Вістар, яких поділили на 2 групи (по 5 тварин у кожній). Тварини 1 (контрольної) групи інтактні. Щурам 2 групи одноразово внутрішньоочеревинно вводили стрептозоточин

(Sigma-Chemical, США) в дозі 50 мг/кг, розчинений в 0,5 мл 0,2 М цитратного буфера pH = 4,5. Для чистоти досліду та лабораторного підтвердження розвитку цукрового діабету через 2 тижні після введення стрептозоточину в усіх експериментальних тварин визначали концентрацію глюкози в крові за допомогою глюкометра GlucoCard-II (Японія).

Після декапітації експериментальних тварин під тіопенталовим наркозом (50 мг/кг) проводили забір підшлункової залози, яку фіксували в розчині Буена (20 годин), після стандартної гістологічної обробки заливали в парапласт (McComick, США).

Для аналізу експресії генів використовували метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу за допомогою набору RTI Profiler™ PCR Array Rat Diabetes (QIAGEN, Німеччина), де об'єктом дослідження у експериментальних тварин була підшлункова залоза.

Статистичний аналіз результатів ПЛР здійснили за допомогою програмного забезпечення PCR GeneGlobe (QIAGEN, Німеччина) з використанням $\Delta\Delta Ct$ методу [1].

Результати

Панель RTI Profiler™ PCR Array Rat Diabetes профілює експресію 84 генів, пов'язаних із виникненням, розвитком і прогресуванням діабету. Вона містить гени, що спричиняють ожиріння, резистентність до інсуліну, ранній початок діабету та його пізні ускладнення. Ці гени представлені функціональними категоріями: рецепторами, транспортерами та каналами; ядерними рецепторами; метаболічними ферментами; факторами секреції; білками передачі сигналу; факторами транскрипції. Багато з включених у панель генів мають тканиноспецифічну або тканинозаміщену модель експресії, на яку також можуть впливати різні патофізіологічні фактори розвитку патології.

За результатами ПЛР дослідження контрольної групи тварин і щурів з експериментальним цукровим діабетом, досліджувані 84 гени розрізняли за активністю: гени з високою експресією порівняно з контрольною групою тварин, де $\Delta\Delta Ct > 30$; гени з низькою експресією щодо контрольної групи, де $\Delta\Delta Ct < 30$; гени, в яких не виявили достовірні зміни в зразках порівняно з контролем (табл. 1).

Таблиця 1. Активність експресії генів у щурів з експериментальним цукровим діабетом по відношенню до показників інтактних щурів

Гени з високою експресією порівняно з контрольною групою тварин, де $\Delta\Delta\text{Ст} >30$	Гени з низькою експресією щодо контрольної групи, де $\Delta\Delta\text{Ст} <30$	Гени, в яких не виявили достовірні зміни в зразках порівняно з контролем*
<i>Nkx2-1</i> ; <i>Pik3r1</i> ; <i>Slc14a2</i>	<i>Ace</i> ; <i>Cd28</i> ; <i>Ctla4</i> ; <i>Dpp4</i> ; <i>Dusp4</i> ; <i>Enpp1</i> ; <i>Foxp3</i> ; <i>G6pc</i> ; <i>Gcgr</i> ; <i>Gck</i> ; <i>Glp1r</i> ; <i>Gpd1</i> ; <i>Gsk3b</i> ; <i>Hmox1</i> ; <i>Ide</i> ; <i>Irfng</i> ; <i>Ikbkb</i> ; <i>Il10</i> ; <i>Il6</i> ; <i>Ins1</i> ; <i>Mapk8</i> ; <i>Nfkb1</i> ; <i>Nsf</i> ; <i>Parp1</i> ; <i>Pdx1</i> ; <i>Pik3cd</i> ; <i>Ppargc1a</i> ; <i>Ptpn1</i> ; <i>Rab4a</i> ; <i>Retn</i> ; <i>Sell</i> ; <i>Snap25</i> ; <i>Sod2</i> ; <i>Stx4</i> ; <i>Stxbp1</i> ; <i>Stxbp2</i> ; <i>Tnf</i> ; <i>Tnfrsf1a</i> ; <i>Tnfrsf1b</i> ; <i>Ucp2</i> ; <i>Vamp2</i> ; <i>Vegfa</i>	<i>Acly</i> ; <i>Adra1a</i> ; <i>Adrb3</i> ; <i>Agt</i> ; <i>Akt2</i> ; <i>Aqp2</i> ; <i>Ccl5</i> ; <i>Ccr2</i> ; <i>Ceacam1</i> ; <i>Cebpa</i> ; <i>Fbp1</i> ; <i>Foxc2</i> ; <i>Foxg1</i> ; <i>Gcg</i> ; <i>Hnf1b</i> ; <i>Hnf4a</i> ; <i>Icam1</i> ; <i>Igfbbp5</i> ; <i>Il12b</i> ; <i>Il4r</i> ; <i>Inpp1</i> ; <i>Irs1</i> ; <i>Irs2</i> ; <i>Mapk14</i> ; <i>Neurod1</i> ; <i>Nos3</i> ; <i>Nrf1</i> ; <i>Ppara</i> ; <i>Pparg</i> ; <i>Pygl</i> ; <i>Serpine1</i> ; <i>Slc2a4</i> ; <i>Snap23</i> ; <i>Srebf1</i> ; <i>Stxbp4</i> ; <i>Tgfb1</i> ; <i>Trib3</i> ; <i>Vamp3</i> ; <i>Vapa</i>

*: середній пороговий цикл цього гена не визначений, а отже його експресія не виявлена.

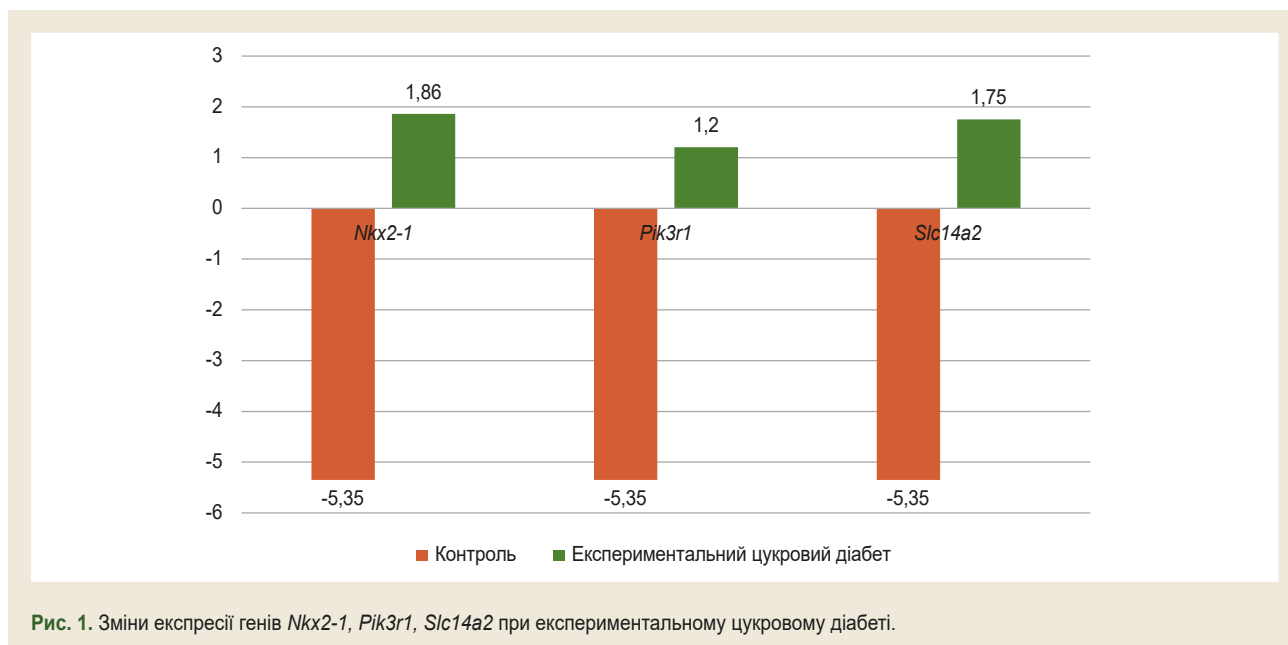


Рис. 1. Зміни експресії генів *Nkx2-1*, *Pik3r1*, *Slc14a2* при експериментальному цукровому діабеті.

Обговорення

Проаналізували експресію мРНК генів *Nkx2-1*, *Pik3r1*, *Slc14a2*, що показали високу активність (рис. 1).

Є переконливі докази, що ген *Nkx2-1* асоційований із виникненням цукрового діабету. В результаті дослідження виявили високу активність його експресії порівняно з такою в інтактній групі дослідження (табл. 1). Повідомляли, що *Nkx2-1* у пацієнтів із цукровим діабетом має вищі показники активності щодо такої в зразках хворих без цукрового діабету [2]. Втім, зауважимо, що в іншому дослідженні повідомляли про зміну характеру експресії *Nkx2-1*, яка, на думку автора, пов'язана зі зниженням активності комплексу мітохондріального м'язового дихального ланцюга, що також є характерним для цукрового діабету [3]. Зазначимо також, що знижена мітохондріальна активність є однією з характеристик діабету [4].

Ген *Pik3r1* відіграє безпосередню роль у передачі сигналів інсуліну [5]. *Pik3r1* – ключовий білок у сигнальному шляху, що регулює виживання клітин, ріст, диференціацію, передачу глюкози та її утилізацію. Дефекти в інсуліновому сигнальному каскаді мають важливе значення під час розвитку резистентності до інсуліну, що має спільну генетичну основу для метаболічних (цукровий діабет, ожиріння) та серцево-судинних захворювань [6]. У нашому дослідженні білок *Pik3r1* має високий рівень експресії,

а отже, враховуючи, що *Pik3r1* відіграє важливу роль у багатьох процесах розвитку, можна припустити: виявлені зміни є компенсаторним механізмом, що передбачає збереження клітинного потенціалу ендокринного апарату підшлункової залози. В інших дослідженнях виявлено, що аномальна експресія *Pik3r1* пов'язана з підвищеною проліферацією клітин і зниженням апоптозу [7].

Білок *Slc14a2* безпосередньо не пов'язаний із патогенезом цукрового діабету на ранніх етапах його прогресування. Ген передусім кодує білок транспортера сечовини, який бере участь у її транспортуванні через клітинні мембрани, зокрема в нирках. Хоча генетичні варіації, що наведено, можуть підвищувати ризик розвитку діабету, *SLC14A2* не вважають основним геном, який пов'язаний із цукровим діабетом, а підвищення його експресії, найімовірніше, впливає на пізні ускладнення, як-от діабетична нефропатія. У кількох дослідженнях використовували глобальні підходи, що ґрунтувалися на експресії, до вивчення повногеномних змін змісту РНК, і навіть визначення нових ідей і нових напрямів дослідження патофізіології діабетичної ниркової недостатності [8–11]. У більш ранніх дослідженнях інших науковців підтверджено, що цукровий діабет впливає на ген *SLC14A2*, який пов'язаний із водним балансом [12].

Висновки

1. Ген *Nkx2-1* асоційований із виникненням цукрового діабету. Виявили високу активність його експресії порівняно з інтактною групою тварин.

2. Білок *Pik3r1* має високий рівень експресії у групі тварин з експериментальним цукровим діабетом. Ці зміни пов'язані з компенсаторним механізмом, що передбачає збереження клітинного потенціалу ендокринного апарату підшлункової залози.

3. Підвищення рівня експресії білка *SLC14A2*, що виявили, імовірно, свідчить про початок розвитку пізніх ускладнень перебігу цукрового діабету, які пов'язані з патологією нирок.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: author has no conflict of interest to declare.

Відомості про автора:

Іваненко Т. В., канд. мед. наук, доцент каф. патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.
ORCID ID: 0000-0001-6617-5178

Information about the author:

Ivanenko T. V., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pathological Physiology with Course of Normal Physiology, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

References

- [1] Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- [2] Takematsu, E., Spencer, A., Auster, J., Chen, P. C., Graham, A., Martin, P., & Baker, A. B. (2020). Genome wide analysis of gene expression changes in skin from patients with type 2 diabetes. *PLoS one*, 15(2), e0225267. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225267>
- [3] Coon, E. A., Ahlskog, J. E., Patterson, M. C., Niu, Z., & Milone, M. (2016). Expanding Phenotypic Spectrum of NKX2-1-Related Disorders-Mitochondrial and Immunologic Dysfunction. *JAMA neurology*, 73(2), 237-238. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.2976>
- [4] Sivitz, W. I., & Yorek, M. A. (2010). Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling*, 12(4), 537-577. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2531>
- [5] Rojek, A., & Niedziela, M. (2010). Insulin receptor and its relationship with different forms of insulin resistance. *Advances in Cell Biology*, 2010, 58-89. <https://doi.org/10.2478/v10052-010-0004-8>
- [6] Honardoost, M., Sarookhani, M. R., Arefian, E., & Soleimani, M. (2014). Insulin resistance associated genes and miRNAs. *Applied biochemistry and biotechnology*, 174(1), 63-80. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1014-z>
- [7] Andrade, V. P., Morrogh, M., Qin, L. X., Olvera, N., Giri, D., Muhsen, S., Sakr, R. A., Schizas, M., Ng, C. K., Arroyo, C. D., Brogi, E., Viale, A., Morrow, M., Reis-Filho, J. S., & King, T. A. (2015). Gene expression profiling of lobular carcinoma in situ reveals candidate precursor genes for invasion. *Molecular oncology*, 9(4), 772-782. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.12.005>
- [8] Knoll, K. E., Pietrusz, J. L., & Liang, M. (2005). Tissue-specific transcriptome responses in rats with early streptozotocin-induced diabetes. *Physiological genomics*, 21(2), 222-229. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00231.2004>
- [9] Yang, L., Brozovic, S., Xu, J., Long, Y., Kralik, P. M., Waigel, S., Zacharias, W., Zheng, S., & Epstein, P. N. (2011). Inflammatory gene expression in OVE26 diabetic kidney during the development of nephropathy. *Nephron. Experimental nephrology*, 119(1), e8-e20. <https://doi.org/10.1159/000324407>
- [10] Zheng, S., Huang, Y., Yang, L., Chen, T., Xu, J., & Epstein, P. N. (2011). Uninephrectomy of diabetic OVE26 mice greatly accelerates albuminuria, fibrosis, inflammatory cell infiltration and changes in gene expression. *Nephron. Experimental nephrology*, 119(1), e21-e32. <https://doi.org/10.1159/000327586>
- [11] Jaffa, M. A., Kobeissy, F., Al Hariri, M., Chalhoub, H., Eid, A., Ziyadeh, F. N., & Jaffa, A. A. (2012). Global renal gene expression profiling analysis in B2-kinin receptor null mice: impact of diabetes. *PLoS one*, 7(9), e44714. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044714>
- [12] Komers, R., Xu, B., Fu, Y., McClelland, A., Kantharidis, P., Mittal, A., Cohen, H. T., & Cohen, D. M. (2014). Transcriptome-based analysis of kidney gene expression changes associated with diabetes in OVE26 mice, in the presence and absence of losartan treatment. *PLoS one*, 9(5), e96987. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096987>



Synthesis and acute toxicity of new S-derivatives (1,2,4-triazole-3(2H)-yl)methyl thiopyrimidines

Yu. V. Karpenko^{1,A-F}, O. I. Panasenko^{1,E-F}, S. M. Kulish^{1,B,C}, A. V. Domnich^{2,B,C}

¹Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine, ²Zaporizhzhia Research Expert Forensic Center of the Ministry of Internal Affairs, Ukraine

A – research concept and design; B – collection and/or assembly of data; C – data analysis and interpretation; D – writing the article; E – critical revision of the article; F – final approval of the article

In the literature, there is insufficient information on the synthesis of compounds in a series of pyrimidine-2-thiol derivatives containing a five-membered nitrogen-containing heterocyclic fragment; at the same time, there are a sufficient number of examples, demonstrating the synthetic and biological potential for compounds of this kind.

The relevance of the study “structure – acute toxicity” relationship in a number of newly synthesized derivatives of 1,2,4-triazole-3(2H)-thione with pyrimidine-2-thiol is due to the synthesis of potential low molecular weight interferon inducers and antitumor agents, the search for molecular descriptors of their structure, important for establishing “structure – acute toxicity” laws, as a system for evaluating the biological effects of compounds. Therefore, it is strategically and economically justified to conduct a study of the acute toxicity of synthesized compounds as a priority.

The aim of the work is targeted synthesis of a number of S-derivatives (1,2,4-triazole-3(2H)-yl)methylthiopyrimidines and the establishment of the “structure – acute toxicity” relationship.

Materials and methods. A modern set of physical-chemical research methods was used to study the compounds. The study of the acute toxicity of the synthesized compounds was performed on adult *Danio rerio*. During the experiments, the fish were kept on a diet for a test period of 96 hours, and their mortality was checked every 24, 48, 72 and 96 hours with the test compounds in each mini-aquarium containing at least 7 individuals of *Danio rerio*.

Results. Results ¹H NMR spectra confirm that the alkylation reaction occurs specifically on the sulfur atom. Thus, after analyzing LC₅₀ data, we found that the least toxic among the studied compounds is 2-(((4-methyl-5-(octylthio)-4H-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)thio)pyrimidine with an acute toxicity value of 49.66 mg/l. The most toxic compound is 2-(((4-methyl-5-(methylthio)-4H-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)thio)pyrimidine with an LC₅₀ value of 8.29 mg/l. The low toxicity of the compound 2-(((4-methyl-5-(octylthio)-4H-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)thio)pyrimidine is most likely due to the presence of an octyl substituent, which sufficiently penetrates through biological membranes and does not have a strong toxic effect on organ systems. Furthermore, it does not accumulate but is metabolized in the cell.

Conclusions. New hybrids of 1,2,4-triazole-3(2H)-yl)methylthiopyrimidines were obtained using the heterocyclization reaction of the intermediate carbothioamide. To reduce the indicators of acute toxicity and increase their biological activity, synthesized S-derivatives of this series were created. It was established that S-derivatives of 1,2,4-triazole-3(2H)-yl)methylthiopyrimidines belong to moderately toxic to low-toxic compounds according to the classification of D. R. Passino. 2-(((4-Methyl-5-(octylthio)-4H-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)thio)pyrimidine has an acute toxicity value of 49.66 mg/l. The most toxic compound is 2-(((4-methyl-5-(methylthio)-4H-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)thio)pyrimidine with an LC₅₀ value of 8.29 mg/l.

Key words: 1,2,4-triazole, pyrimidine, acute toxicity, *Danio rerio*, LC₅₀ concentration.

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(2), 158-164

Синтез і гостра токсичність нових S-похідних (1,2,4-тріазол-3(2H)-іл)метилтіопіримідинів

Ю. В. Карпенко, О. І. Панасенко, С. М. Куліш, А. В. Домніч

У фаховій літературі недостатньо відомостей щодо синтезу сполук у ряду похідних піримідин-2-тіолу, що містять п'ятичленний нітроген-вмісний гетероциклічний фрагмент, водночас подано достатню кількість прикладів, продемонстровано синтетичний і біологічний потенціал сполук цього типу.

Актуальність дослідження зв'язку «структура – гостра токсичність» у ряду новосинтезованих похідних 1,2,4-тріазол-3(2H)-тіону з піримідин-2-тіолом зумовлена синтезом потенційно низьких молекулярно-масових індукторів інтерферону й протипухлинних засобів, а також необхідністю пошуку молекулярних дескрипторів їхньої структури, важливих для встановлення закономірностей

ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/274586>

UDC 615.2.015.4.012.1:547.793

DOI: [10.14739/2409-2932.2023.2.274586](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2023.2.274586)

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(2), 158-164

Key words: 1,2,4-triazole, pyrimidine, acute toxicity, *Danio rerio*, LC₅₀ concentration.

*E-mail: karpenko.y.v@gmail.com

Received: 27.02.2023 // Revised: 14.03.2023 // Accepted: 28.03.2023

зв'язку «структура – гостра токсичність» як системи оцінювання біологічних ефектів сполук. Тому нині стратегічно й економічно виправданим є першочергове дослідження гострої токсичності синтезованих сполук.

Мета роботи – цілеспрямований синтез ряду S-похідних (1,2,4-тріазол-3(2H)-іл)метилтіопіримідинів, встановлення зв'язку «структура – гостра токсичність».

Матеріали та методи. Для дослідження сполук використано сучасний комплекс фізико-хімічних методів дослідження. Гостру токсичність синтезованих сполук дослідили на дорослих особинах *Danio rerio*. Під час експериментів риб утримували на дієті протягом тестового періоду тривалістю 96 годин і перевіряли їхню смертність кожні 24, 48, 72 і 96 годин у тестових комплексах у кожному міні-акваріумі з принаймні 7 особинами *Danio rerio*.

Результати. Результати спектрів ЯМР ¹H підтверджують проходження реакції алкілювання саме на атомі Сульфуру. Отже, проаналізувавши дані LC₅₀, виявили, що найменш токсичною серед досліджуваних сполук є 2-(((4-метил-5-(октилтіо)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)тіо)піримідин з показником гострої токсичності 49,66 мг/л. Найбільш токсичною сполукою є 2-(((4-метил-5-(метилтіо)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)тіо)піримідин з показником LC₅₀ = 8,29 мг/л. Низька токсичність сполуки 2-(((4-метил-5-(октилтіо)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)тіо)піримідину, найімовірніше, зумовлена наявністю октилового замісника, який достатньою мірою проникає через біологічні мембрани і не має сильного токсичного впливу на системи органів і не накопичується, а метаболізується в клітині.

Висновки. За допомогою реакції гетероциклізації проміжного карботіоаміду отримано нові гібриди 1,2,4-тріазол-3(2H)-іл)метилтіопіримідинів. Для зниження показників гострої токсичності та підвищення їхньої біологічної активності синтезовано S-похідні цього ряду. Встановлено, що S-похідні 1,2,4-тріазол-3(2H)-іл)метилтіопіримідинів належать до помірної, малотоксичних сполук, згідно з класифікацією D. R. Passino. 2-(((4-Метил-5-(октилтіо)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)тіо)піримідин має значення гострої токсичності 49,66 мг/л. Найбільш токсичною сполукою є 2-(((4-метил-5-(метилтіо)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)тіо)піримідин з показником LC₅₀ = 8,29 мг/л.

Ключові слова: 1,2,4-тріазол, піримідин, гостра токсичність, *Danio rerio*, концентрація LC₅₀.

Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2023. Т. 16, № 2(42). С. 158-164

Pyrimidine-2-thiol has many applications in organic chemistry. It can be used as a lactam protector in organic synthesis to prevent unwanted reactions with cyclic amides. It can also serve as an intermediate in the production of pharmaceuticals.

Pyrimidine-2-thiol also has biological activity and can be used for medicinal purposes. Some studies show that it has anti-inflammatory properties and can be used to treat certain inflammatory conditions such as arthritis. It has also been found that it may have anti-tumor activity, research in this area is ongoing [1].

1,2,4-triazole-3(2H)-thiol is used in the synthesis of various biologically active compounds, such as pharmaceuticals, antioxidants and others [2,3]. It can be used as a catalyst for various chemical reactions, as well as an inhibitor for certain enzymes.

It is also known that 1,2,4-triazole-3(2H)-thiol has antibacterial and anti-inflammatory activity [4]. This compound may have potential medical applications in the treatment of infections and inflammation. However, more research is needed to establish the effectiveness and safety of this compound before it can be used in medicine.

In the literature, there is insufficient information on the synthesis of compounds in a series of pyrimidine-2-thiol derivatives containing a five-membered nitrogen-containing heterocyclic fragment; at the same time, there are a sufficient number of examples [5], demonstrating the synthetic and biological potential for compounds of this kind.

The relevance of the study of the “structure – acute toxicity” relationship in a number of newly synthesized derivatives of 1,2,4-triazole-3(2H)-thione with pyrimidine-2-thiol is due to the synthesis of potential low molecular weight interferon inducers and antitumor agents, as well as the search

for molecular descriptors of their structure, important for establishing “structure – acute toxicity” laws as a system for evaluating the biological effects of compounds. Therefore, it is strategically and economically justified to conduct a study of the acute toxicity of synthesized compounds as a priority.

Aim

The purpose of the work is targeted synthesis of a number of S-derivatives (1,2,4-triazole-3(2H)-yl)methylthiopyrimidines and the establishment of the “structure – acute toxicity” relationship.

Materials and methods

The ¹H spectra were recorded on a Bruker AC-400 spectrometer (400 MHz, respectively) in DMSO-d₆, the internal standard was TMS. LC-MS were recorded on a high-performance liquid chromatograph Agilent 1260 Infinity HPLC System and with the help of a diode array detector with proton ionization. Elemental analysis (C, H, N, S) was made on ELEMENTAR vario EL cube (standard – sulfanilamide). The melting points were determined by the capillary method in “Stanford Research Systems Melting Point Apparatus 100” (SRS, USA). The used reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Merck).

Compounds 1.1, 1.2, 1.3 were synthesized using the well-known method [6, 7] with constants corresponding to literature data.

N-methyl-2-(2-(pyrimidin-2-ylthio)acetyl)hydrazine-1-carbothioamide (1.4). Yield 92 %, yellow powder, Mp 278 °C (DMF). ¹H NMR spectrum, δ, ppm. (J, Hz): 2.93 (d, J = 1.2 Hz, 3H), 3.86 (s, 2H), 7.21 (t, J = 4.4 Hz, 1H), 7.50–7.54 (m, 1H), 8.56 (d, J = 4.4 Hz, 2H), 9.55 (d, J = 5.2 Hz, 1H),

9.77 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H). Mass spectrum, m/z (I_{rel} , %) 258 $[M+H]^+$ (100). Found, %: C 37.31; H 4.33; N 27.20; S 24.95. $C_8H_{11}N_5OS_2$. Calculated, %: C 37.34; H 4.31; N 27.22; S 24.92.

Obtaining of 4-methyl-5-((pyrimidin-2-ylthio)methyl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol 1.5 (general methods). A mixture of 0.01 mol of 2-(pyrimidin-2-ylthio)acetohydrazide, 0.01 mol of sodium hydroxide, and 50 ml of purified water is boiled for 2 hours. After complete cooling, 2 ml of concentrated ethanoic acid is added to the filtrate. The resulting precipitate is filtered and washed with purified water. For analysis, it was purified by recrystallization from DMF. Light yellow powder, soluble in aqueous solutions of alkalis, DMF and 1,4-dioxane.

4-methyl-5-((pyrimidin-2-ylthio)methyl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol (1.5). Yield 72 %, light yellow powder, Mp 266 °C (DMF). 1H NMR spectrum, δ , ppm. (J , Hz): 3.55 (s, 3H), 4.43 (s, 2H), 7.19 (t, $J = 4.4$ Hz, 1H), 8.53 (d, $J = 4.4$ Hz, 2H), 12.83 (s, 1H). Mass spectrum, m/z (I_{rel} , %) 240 $[M+H]^+$ (100). Found, %: C 40.11; H 3.82; N 29.35; S 26.71. $C_8H_9N_5S_2$. Calculated, %: C 40.15; H 3.79; N 29.26; S 26.79.

Obtaining of S-alkyl derivatives 4-methyl-5-((pyrimidin-2-ylthio)methyl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiols 1.6–1.15 (general methods). A mixture of 0.005 mol of 4-methyl-5-((pyrimidin-2-ylthio)methyl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol and 0.005 mol of sodium hydroxide dissolved in 50 ml of propan-2-ol is prepared. Then, add 0.005 mole of haloalkane (iodomethane, bromoethane, 1-bromopropane, 1-bromobutane, 1-bromopentane, 1-bromohexane, 1-bromoheptane, 1-bromooctane, 1-bromononane, 1-bromodecane). Heat the mixture for 2 hours, cool, filter the sediment, and wash it with purified water. For analysis, crystallize the compounds from methanol. The obtained crystalline substances (1.6–1.15) are yellow or brown in color, insoluble in water, and soluble in organic solvents.

2-(((4-methyl-5-(methylthio)-4H-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)thio)pyrimidine (1.6). Yield 86 %, yellow powder, Mp 251 °C (MeOH). 1H NMR spectrum, δ , ppm. (J , Hz): 2.71 (s, 3H), 3.55 (s, 3H), 4.51 (s, 2H), 7.21 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 8.59 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H). Mass spectrum, m/z (I_{rel} , %) 254 $[M+H]^+$ (100). Found, %: C 42.63; H 4.29; N 27.67; S 25.38. $C_9H_{11}N_5S_2$. Calculated, %: C 42.67; H 4.38; N 27.64; S 25.31.

2-(((5-(ethylthio)-4-methyl-4H-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)thio)pyrimidine (1.7). Yield 93 %, yellow powder, Mp 246 °C (MeOH). 1H NMR spectrum, δ , ppm. (J , Hz): 1.39 (t, $J = 8.0$ Hz, 3H), 3.16 (q, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.55 (s, 3H), 4.51 (s, 2H), 7.21 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 8.60 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H). Mass spectrum, m/z (I_{rel} , %) 268 $[M+H]^+$ (100). Found, %: C 44.87; H 4.98; N 26.17; S 24.05. $C_{10}H_{13}N_5S_2$. Calculated, %: C 44.92; H 4.90; N 26.19; S 23.98.

2-(((4-methyl-5-(propylthio)-4H-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)thio)pyrimidine (1.8). Yield 82 %, yellow powder, Mp 245 °C (MeOH). 1H NMR spectrum, δ , ppm. (J , Hz): 1.05 (t, $J = 8.0$ Hz, 3H), 1.72–1.76 (m, 2H), 3.13 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.55 (s, 3H), 4.51 (s, 2H), 7.21 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 8.61 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H). Mass spectrum, m/z (I_{rel} , %) 282 $[M+H]^+$ (100). Found, %: C 46.91; H 5.41; N 24.82; S 22.81. $C_{11}H_{15}N_5S_2$. Calculated, %: C 46.95; H 5.37; N 24.89; S 22.79.

2-(((5-(butylthio)-4-methyl-4H-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)thio)pyrimidine (1.9). Yield 91 %, yellow powder, Mp 241 °C (MeOH). 1H NMR spectrum, δ , ppm. (J , Hz): 0.94 (t, $J = 8.0$ Hz, 3H), 1.36–1.50 (m, 2H), 1.64–1.76 (m, 2H), 3.10 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.56 (s, 3H), 4.51 (s, 2H), 7.21 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 8.61 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H). Mass spectrum, m/z (I_{rel} , %) 296 $[M+H]^+$ (100). Found, %: C 48.81; H 5.78; N 23.76; S 21.65. $C_{12}H_{17}N_5S_2$. Calculated, %: C 48.79; H 5.80; N 23.71; S 21.70.

2-(((4-methyl-5-(pentylthio)-4H-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)thio)pyrimidine (1.10). Yield 94 %, yellow powder, Mp 238 °C (MeOH). 1H NMR spectrum, δ , ppm. (J , Hz): 0.83–0.94 (m, 3H), 1.29–1.39 (m, 1H), 1.34–1.45 (m, 3H), 1.67–1.78 (m, 2H), 3.18 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.58 (s, 3H), 4.51 (s, 2H), 7.21 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 8.61 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H). Mass spectrum, m/z (I_{rel} , %) 310 $[M+H]^+$ (100). Found, %: C 50.43; H 6.14; N 22.69; S 20.76. $C_{13}H_{19}N_5S_2$. Calculated, %: C 50.46; H 6.19; N 22.63; S 20.72.

2-(((5-(hexylthio)-4-methyl-4H-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)thio)pyrimidine (1.11). Yield 88 %, yellow powder, Mp 237 °C (MeOH). 1H NMR spectrum, δ , ppm. (J , Hz): 0.84–0.95 (m, 3H), 1.24–1.36 (m, 6H), 1.65–1.76 (m, 2H), 3.15 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.60 (s, 3H), 4.51 (s, 2H), 7.21 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 8.61 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H). Mass spectrum, m/z (I_{rel} , %) 254 $[M+H]^+$ (100). Found, %: C 51.95; H 6.58; N 21.66; S 19.80. $C_{14}H_{21}N_5S_2$. Calculated, %: C 51.98; H 6.54; N 21.65; S 19.82.

2-(((5-(heptylthio)-4-methyl-4H-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)thio)pyrimidine (1.12). Yield 78 %, yellow powder, Mp 232 °C (MeOH). 1H NMR spectrum, δ , ppm. (J , Hz): 0.84–0.95 (m, 3H), 1.23–1.38 (m, 8H), 1.65–1.76 (m, 2H), 3.16 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.61 (s, 3H), 4.54 (s, 2H), 7.21 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 8.61 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H). Mass spectrum, m/z (I_{rel} , %) 338 $[M+H]^+$ (100). Found, %: C 53.46; H 6.82; N 20.81; S 18.91. $C_{15}H_{23}N_5S_2$. Calculated, %: C 53.38; H 6.87; N 20.75; S 19.00.

2-(((4-methyl-5-(octylthio)-4H-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)thio)pyrimidine (1.13). Yield 82 %, light brown powder, Mp 228 °C (MeOH). 1H NMR spectrum, δ , ppm. (J , Hz): 0.83–0.96 (m, 3H), 1.21–1.46 (m, 10H), 1.65–1.76 (m, 2H), 3.16 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.62 (s, 3H), 4.54 (s, 2H), 7.20 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 8.61 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H). Mass spectrum, m/z (I_{rel} , %) 352 $[M+H]^+$ (100). Found, %: C 54.73; H 7.12; N 19.97; S 18.18. $C_{16}H_{25}N_5S_2$. Calculated, %: C 54.67; H 7.17; N 19.92; S 18.24.

2-(((4-methyl-5-(nonylthio)-4H-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)thio)pyrimidine (1.14). Yield 91 %, light brown powder, Mp 227 °C (MeOH). 1H NMR spectrum, δ , ppm. (J , Hz): 0.83–0.96 (m, 3H), 1.20–1.46 (m, 12H), 1.65–1.76 (m, 2H), 3.14 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.64 (s, 3H), 4.53 (s, 2H), 7.20 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 8.61 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H). Mass spectrum, m/z (I_{rel} , %) 366 $[M+H]^+$ (100). Found, %: C 55.91; H 7.40; N 19.11; S 17.59. $C_{17}H_{27}N_5S_2$. Calculated, %: C 55.86; H 7.45; N 19.16; S 17.54.

2-(((5-(decylthio)-4-methyl-4H-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)thio)pyrimidine (1.15). Yield 91 %, brown powder, Mp 225 °C (MeOH). 1H NMR spectrum, δ , ppm. (J , Hz): 0.84–0.95 (m, 3H), 1.20–1.32 (m, 10H), 1.28–1.40 (m, 2H), 1.35–1.47 (m, 2H), 1.70–1.74 (m, 2H), 3.14 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.67 (s, 3H), 4.53 (s, 2H), 7.18 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 8.61 (d, $J =$

7.5 Hz, 2H). Mass spectrum, m/z (I_{rel} , %) 380 $[M+H]^+$ (100). Found, %: C 56.92; H 7.74; N 18.52; S 16.82. $C_{18}H_{29}N_5S_2$. Calculated, %: C 56.96; H 7.70; N 18.45; S 16.89.

Study of acute toxicity of synthesized compounds on adult of *Danio rerio*. The experiment used 2-months-old fish, 11.8 ± 0.1 mm in length and 2.6 ± 0.2 g in weight.

The concentration of the studied compound ranged from 5.0 to 100.0 mg/l. *Danio rerio* adults were kept in aerated aquariums with carbon-filtered tap water (pH = 7.3 ± 0.3 ; 95 % Cl) at a temperature of 26.5 °C. Oxygen-enriched water was also used for experiments. Before setting up the experiments, the fish were acclimatized, with a mortality rate of no more than 1 in 500 individuals. The studied newly synthesized compounds were first emulsified in ERCASORB 2080 and then dissolved in distilled water. Each mini-aquarium with a specific dose of the compound contained at least 7 individuals of *Danio rerio*. During the experiments, the fish were kept on a diet for the 96-hour test period, and their mortality was checked every 24, 48, 72 and 96 hours.

Fish are considered dead if there is no visible movement (e.g., gill movements) and if the caudal peduncle does not elicit a reaction. Dead fish were removed during observation and mortality was recorded.

Statistical analysis of the obtained results was carried out using the STATISTICA 6 program. The degree of toxicity of the studied compounds was determined according to the classification D. R. Passino [8].

Results

One of the well-known methods of synthesis of 5-substituted-1,2,4-triazole-3(2H)-thiones consists in the synthesis of intermediate carbothioamides followed by heterocyclization in an alkaline medium [9,10]. Therefore, the previously obtained hydrazide **1.3** was reacted with methyl isothiocyanate in an ethanol medium to form the intermediate product carbothioamide **1.4**, and further cyclization was carried out under the influence of an aqueous solution of sodium hydroxide for 2 hours with stirring on a magnetic stirrer. The obtained

solution was acidified with glacial acetic acid, resulting in the precipitation of compound **1.5** (Fig. 1).

It is known that the presence of alkyl substituents at the sulfur atom in 1,2,4-triazole-3(2H)-thiones increases their biological activity. For this reason, it was expedient to obtain S-derivatives of (1,2,4-triazole-3(2H)-yl)methylthiopyrimidines.

Alkyl derivatives (**1.6–1.15**) were obtained by the reaction of the starting thione **1.5** and the corresponding haloalkane in the medium of a polar solvent – ethanol with the addition of an equimolar amount of sodium hydroxide.

Subsequently, the compounds were tested for acute toxicity on *Danio rerio* hydrobionts for 96 hours, and lethal concentrations were calculated. Four compounds were selected for the study.

Mortality every 24, 48, 72 and 96 hours was tabulated for each concentration / percentage respectively (Table 1).

Based on the obtained data, graphs of the dependence of concentration on fish mortality percentage were constructed, and the corresponding LC_{50} values of the newly synthesized compound were calculated.

Discussion

The 1H NMR spectra of the compound are characterized by a singlet signal of the protons of the $-S-CH_2$ group at the pyrimidine ring at 4.51 ppm, and in the case of the 1,2,4-triazole nucleus, it is manifested by a singlet at 3.16 ppm. The presence of these pixels confirms the passage of the alkylation reaction precisely on the sulfur atom. The proton signal of the thiol group was registered in the spectrum of compound **1.5** at 12.83 ppm. in the form of a singlet. All S-derivatives (1,2,4-triazole-3(2H)-yl)methylthiopyrimidines are characterized by the signals of 3 protons of the pyrimidine ring at 7.21 ppm and 8.59 ppm in the form of doublets and triplets with a characteristic coupling constant for aromatic rings.

It is known that along with indicators of biological activity of molecule, its toxicity class should also be taken into

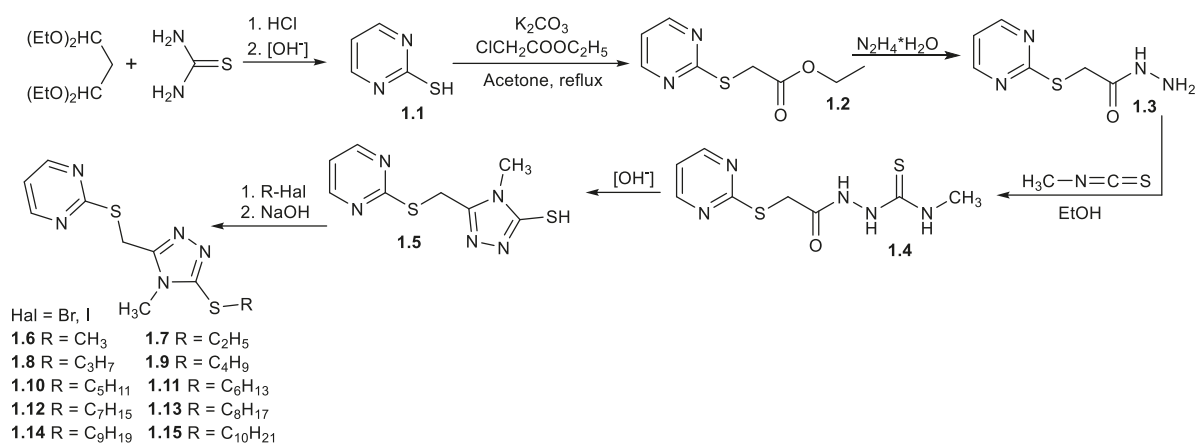


Fig. 1. Synthesis of molecular hybrids of 1,2,4-triazole and pyrimidine-2-thione as potential multifunctional agents with low toxicity.

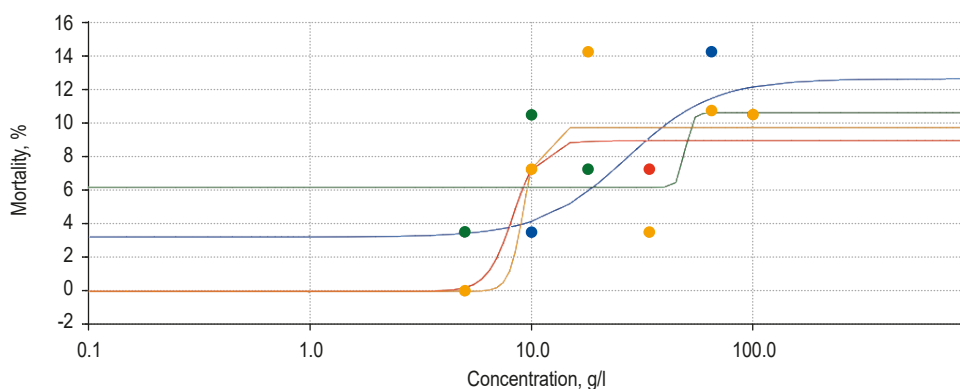


Fig. 2. Graph of dependence of concentration on % mortality of fish.

Table 1. Mortality results obtained at 24, 48, 72 and 96 hour intervals are given respectively as the number of deaths / percent of total (%) of some S-derivatives of (1,2,4-triazole-3(2H)-yl)methylthiopyrimidines

The concentration, mg/l	Time	1.5	1.6	1.13	1.15
5	24 hours	0	0	0	0
	48 hours	0	0	0	0
	72 hours	0	0	0	0
	96 hours	1 / 14	0	1 / 14	0
10	24 hours	0	0	0	0
	48 hours	0	0	0	0
	72 hours	0	0	0	0
	96 hours	1 / 14	2 / 29	3 / 42	2 / 29
18	24 hours	0	0	0	0
	48 hours	0	0	0	0
	72 hours	0	0	0	0
	96 hours	2 / 29	2 / 29	2 / 29	4 / 57
34	24 hours	0	0	0	0
	48 hours	0	0	0	0
	72 hours	0	0	0	0
	96 hours	2 / 29	2 / 29	1 / 14	1 / 14
65	24 hours	0	0	0	0
	48 hours	0	0	2 / 29	0
	72 hours	2 / 29	2 / 29	0	2 / 29
	96 hours	4 / 57	1 / 14	1 / 14	1 / 14
100	24 hours	0	0	0	0
	48 hours	0	0	0	0
	72 hours	0	0	0	0
	96 hours	3 / 42	3 / 42	3 / 42	3 / 42

Table 2. Acute toxicity of compounds of some S-derivatives of (1,2,4-triazole-3(2H)-yl)methylthiopyrimidines

Parameter	1.5	1.6	1.13	1.15
LC ₅₀ , mg/l	27.07	8.29	49.66	9.24
Relative toxicity	Slightly toxic	Moderately toxic	Slightly toxic	Moderately toxic

account. These data are often related to each other and are usually directly proportional. Therefore, before conducting any preclinical studies of new potential drugs, it is advisable to start an experiment to establish indicators of acute toxicity. From a practical point of view, the expediency of the above-mentioned method consists in the further use of LC_{50} values to calculate the doses of the studied substances when administered in subsequent experiments to determine biological activity (Fig. 2).

Thus, after analyzing LC_{50} data (Table 2), we found that the least toxic among the studied compounds is 2-(((4-methyl-5-(octylthio)-4H-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)thio)pyrimidine (1.13) with an acute toxicity value of 49.66 mg/l. The most toxic compound is 2-(((4-methyl-5-(methylthio)-4H-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)thio)pyrimidine (1.6). with the LC_{50} value of 8.29 mg/l.

The low toxicity of the compound 2-(((4-methyl-5-(octylthio)-4H-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)thio)pyrimidine (1.13) is most likely caused by the presence of an octyl substituent, which sufficiently penetrates through biological membranes and does not have a strong toxic effect on organ systems and does not accumulate, but is metabolized in the cell.

According to the acute toxicity LC_{50} (96 hours) of the compounds, as classified by D. R. Passino and co-authors [8], they can be assigned to the classes of moderately toxic to low-toxic compounds.

The following clinical signs were observed in experimental animals: at low concentrations (5–10 mg/l), exophthalmia (swelling in the orbital pits, which leads to bulging of one or both eyes) and increased spontaneous activity were observed. The middle range of concentrations (18–65 mg/l) was marked by the appearance of petechiae (small spots) or hematoma (area of blood) due to intradermal or submucosal bleeding in fish, as well as excessive mucus production. At high concentrations (100 mg/l), abdominal swelling due to fluid accumulation was observed, which may cause bulging scales and/or a crack in the abdominal wall.

Conclusions

1. New hybrids of 1,2,4-triazole-3(2H)-yl)methyl)thiopyrimidines were obtained using the heterocyclization reaction of the intermediate carbothioamide. To reduce the indicators of acute toxicity and increase their biological activity, synthesized S-derivatives of this series.

2. It was established that S-derivatives of 1,2,4-triazole-3(2H)-yl)methyl)thiopyrimidines belong to moderately toxic to low-toxic compounds according to the classification of D. R. Passino.

3. 2-(((4-Methyl-5-(octylthio)-4H-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)thio)pyrimidine (1.13) with an acute toxicity value of 49.66 mg/l. The most toxic compound is 2-(((4-methyl-5-(methylthio)-4H-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)thio)pyrimidine (1.6). with the LC_{50} value of 8.29 mg/l.

Prospects for further research. The results of the work made it possible to plan further pharmacological studies based on the parameters of acute toxicity and to identify the most toxic

pharmacophores in the compound. To supplement the virtual library of 1,2,4-triazole derivatives as promising biologically active compounds.

Funding

The research is carried out within the SRW of Zaporizhzhia State Medical University "Synthesis, modification and study of the properties of 1,2,4-triazole derivatives for the purpose of antimicrobial drug production", state registration No. 0120U101649 (2020–2022).

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Information about authors:

Karpenko Yu. V., PhD, Senior Lecturer of the Department of Natural Sciences for Foreign Students and Toxicological Chemistry, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

ORCID ID: 0000-0002-4390-9949

Panasenko O. I., PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Natural Sciences for Foreign Students and Toxicological Chemistry, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

ORCID ID: 0000-0002-6102-3455

Kulish S. M., PhD, Associate Professor of the Department of Natural Sciences for Foreign Students and Toxicological Chemistry, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

ORCID ID: 0000-0003-0545-993X

Domnich A. V., forensic expert, Zaporizhzhia Research Expert Forensic Center of the Ministry of Internal Affairs, Ukraine.

ORCID ID: 0000-0001-6076-8386

Відомості про авторів:

Карпенко Ю. В., канд. хім. наук, ст. викладач каф. природничих дисциплін для іноземних студентів та токсикологічної хімії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

Панасенко О. І., д-р фарм. наук, професор, зав. каф. природничих дисциплін для іноземних студентів та токсикологічної хімії,

Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

Куліш С. М., канд. фарм. наук, доцент каф. природничих дисциплін для іноземних студентів та токсикологічної хімії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

Домніч А. В., судовий експерт, Запорізький науково-дослідний експертно-криміналістичний центр МВС, Україна.

References

- [1] Karpenko, Yu. V., Panasenko, O. I., & Knysh, Ye. H. (2020). Biologichno oriientovaniy syntez likiv (BIODS) na osnovi heterylpokhidnykh 2,5 dyzamyshchennykh 1,3,4-oksadiazoliv (Chastyna 1) [Biologically oriented synthesis of medicines (BIODS) based on heterylpoxid 2,5-disubstituted 1,3,4-oxadiazoles (Part 1)]. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*, 13(2), 390-398. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2020.2.207211>
- [2] Varynskyi, B., Parchenko, V., Kaplaushenko, A., Panasenko O., & Knysh, Ye. Development and Validation of a LC-ESI-MS Method for Detection of Piperidin-1-IUM {[5-(2-Furyl)-4-Phenyl-4H-1,2,4-Triazol-3-YL]Thio}acetate Residues in Poultry Eggs. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 2016, 40(3), 29-40. https://doi.org/10.1501/Eczfak_0000000586
- [3] Karpenko, Yu. V., & Panasenko, O. I. (2021). Search for antibacterial activity in a number of new S-derivatives (1,2,4-triazole-3(2H)-yl)methyl)thiopyrimidines. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*, 14(2), 173-178. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2021.2.234565>
- [4] Zazharskyi, V., Parchenko, M., Parchenko, V., Davydenko, P., Kulishenko, O., & Zazharska N. (2020). Physicochemical properties of new S-derivatives of 5-(5-bromofuran-2-yl)-4-methyl-1,2,4-triazol-3-thiols. *Voprosy khimii i khimicheskoi tekhnologii*, (6), 50-58. <https://doi.org/10.32434/0321-4095-2020-133-6-50-58>

- [5] Gotsulya, A., & Brytanova, T. (2022). Synthesis, properties and biological potential some condensed derivatives 1,2,4-triazole. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 46(2), 308-321. <https://doi.org/10.33483/jfpau.971602>
- [6] Kaplancıklı, Z., Yurttaş, L., Turan-Zitouni, G., Özdemir, A., Göger, G., Demirci, F., Mohsen, A. U. (2013). Synthesis and Antimicrobial Activity of New Pyrimidine-Hydrazones. *Letters in Drug Design & Discovery*, 11(1), 76-81. <https://doi.org/10.2174/15701808113109990037>
- [7] Karpenko, Y., Hunchak, Y., Gutyj, B., Hunchak, A., Parchenko, M., & Parchenko, V. (2022). Advanced research for physico-chemical properties and parameters of toxicity piperazinium 2-((5-(furan-2-yl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, (2), 18-25. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.255848>
- [8] Passino, D. R. M., & Smith, S. B. (1987). Acute bioassays and hazard evaluation of representative contaminants detected in great lakes fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 6(11), 901-907. <https://doi.org/10.1002/etc.5620061111>
- [9] Khilkovets, A., Karpenko, Y., Bigdan, O., Parchenko, M., & Parchenko, V. (2022). Synthetic and Biological Aspects of Studying the Properties of 1,2,4-Triazole Derivatives. *Scientific Journal of Polonia University*, 51(2), 324-331. <https://doi.org/10.23856/5138>
- [10] Zozulynets, D. M., Kaplaushenko, A. G., & Korzhova, A. S. (2021). Syntez ta vzaiemodijia z aldehydamy 4-amino-5-(kvinolin-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-tiolu [The synthesis of 4-amino-5-(quinolin-2-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol and its interaction with aldehydes]. *Zhurnal orhanichnoi ta farmatsevtichnoi khimii*, 19(1), 48-52. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.24959/ophcj.21.188137>



Diuretic activity of some 4- and 3-thio-substituted 1,2,4-triazoles with fluorophenyl fragments

O. A. Bihdan^{ID}*1,A,B,D, V. V. Parchenko^{ID}1,E,F, B. P. Kyrychko^{ID}2,B,C,D, T. V. Zvenyhorodska^{ID}2,B,C, D. M. Romanina^{ID}1,A,C

¹Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine, ²Poltava State Agrarian Academy, Ukraine

A – research concept and design; B – collection and/or assembly of data; C – data analysis and interpretation; D – writing the article; E – critical revision of the article; F – final approval of the article

Diuretics increase the volume of urine and sodium excretion, and therefore are often used to remove excess fluid from the body during various diseases, including hypertension, heart and kidney failure, nephrotic syndrome, cirrhosis, etc. Until now, a wide range of diuretics is known, but none of them is completely safe and has a number of side effects.

The aim of the work is to investigate the diuretic activity of 1,2,4-triazole derivatives containing fluorophenyl substituents at the fifth position of the 1,2,4-triazole fragment, as well as to establish the relationship between “chemical structure and diuretic action” among derivatives 1,2,4-triazole.

Materials and methods. To study the effect on kidney function, six groups of animals with seven rats each were used. When studying water diuresis, rats were kept on a constant diet with free access to water. Before water loading (5 % of body weight), rats were fasted for 2 hours without food and water. Since all tested compounds were insoluble in water, they were administered orally as an aqueous suspension stabilized with Tween-80. The compounds were administered at a dose of 1/10 LD₅₀.

Results. The diuretic activity of 28 new compounds of a number of substituted 1,2,4-triazole-3-thiols, which according to their chemical structure belong to different classes of compounds, was investigated.

Conclusions. Analysis of the results of diuretic activity indicates that there are a number of compounds whose activity is higher than hypothiazide, as well as a compound that exceeds the activity of furosemide.

Key words: diuretic effect, 1,2,4-triazole derivatives, “structure – action”.

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(2), 165-169

Діуретична активність деяких 4- і 3-тіозаміщених 1,2,4-тріазолів із фторфенільними фрагментами

O. A. Бігдан, В. В. Парченко, Б. П. Киричко, Т. В. Звенигородська, Д. М. Романіна

Діуретики збільшують об'єм виділеної сечі та виведення натрію, їх часто використовують для зменшення надлишку рідини в організмі при різних захворюваннях: артеріальній гіпертензії, серцевій і нирковій недостатності, нефротичному синдромі, цирозі тощо. Нині на ринку доступний широкий вибір діуретиків, але немає жодного безпечного засобу – всі препарати спричиняють певні побічні ефекти.

Мета роботи – вивчення діуретичної активності похідних 1,2,4-тріазолу, що містять при в'язанні 1,2,4-тріазолового фрагмента фторфенільні замісники, а також встановлення взаємозв'язку «хімічна структура – сечогінна дія» серед похідних 1,2,4-тріазолу.

Матеріали та методи. Для вивчення впливу на функцію нирок здійснили дослідження на 6 групах по 7 щурів у кожній. Під час дослідження водного діурезу щурів утримували на постійній дієті з вільним доступом до води. Перед навантаженням водою (5 % від маси тіла) щурів витримували 2 години без їжі та води. Усі сполуки, які вивчали, нерозчинні в воді, тому їх вводили перорально як водну суспензію, стабілізовану твіном-80. Сполуки вводили в дозі 1/10 LD₅₀.

Результати. Дослідили діуретичну активність 28 нових сполук ряду заміщених 1,2,4-тріазол-3-тіолів, які за хімічною будовою належать до різних класів сполук.

Висновки. Аналіз результатів діуретичної активності показав: є ряд сполук, активність яких вища за гіпотіазид, а також є сполука, що перевищує активність фуросеміду.

Ключові слова: діуретична активність, похідні 1,2,4-тріазолу, «структура – дія».

Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2023. Т. 16, № 2(42). С. 165-169

ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/277468>

UDC 547.792:615.31:615.254.1.015.11
DOI: [10.14739/2409-2932.2023.2.277468](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2023.2.277468)

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(2), 165-169

Key words: diuretic effect, 1,2,4-triazole derivatives, “structure – action”.

*E-mail: abigdana@gmail.com

Received: 11.04.2023 // Revised: 25.04.2023 // Accepted: 27.04.2023

The achievements of Ukrainian scientists in the field of synthetic organic chemistry significantly contribute to the development of world science. Among the variety of known organic compounds, the heterocyclic system of 1,2,4-triazole deserves special attention, as it has been at the center of research for decades [1,2,5]. The 1,2,4-triazole cycle has unique properties, which make it a very attractive target for research [3,4].

Numerous publications by various scientific teams from around the world have demonstrated the high reactivity of 1,2,4-triazole derivatives, as well as their low toxicity [6,10], and a wide range of possibilities for their use as potential biologically active compounds [7–9]. Promising properties of some 1,2,4-triazole derivatives, which are used as effective plant growth regulators, have been described in [8,11]. It is worth emphasizing the possibility of using 1,2,4-triazole derivatives as veterinary drugs [9,10].

In particular, the drug “Trifuzol-Neo” is widely used in veterinary medicine, which has recently gained popularity due to its effectiveness. At the stage of registration is a new original antifungal veterinary drug in the form of liniment “VetMicoDerm”. Therefore, the continuation of research related to the synthesis of new derivatives of 1,2,4-triazole, as well as the study of the pharmacological properties of new derivatives is an important scientifically attractive area, which undoubtedly offers promising opportunities in various aspects of human life.

In our opinion, the study of the diuretic activity of new 1,2,4-triazole derivatives deserves special attention. First, the creation of new diuretics is relevant today, and secondly, there is information that some 1,2,4-triazole derivatives have high diuretic activity [9]. Therefore, the aim of our work was to investigate the diuretic activity of new substituted 1,2,4-triazole-3-thiols.

Aim

The aim of the work is to study the diuretic activity of 1,2,4-triazole derivatives containing fluorophenyl substituents at the fifth position of the 1,2,4-triazole fragment, as well as to establish the relationship between “chemical structure and diuretic action” among derivatives 1,2,4-triazole.

Materials and methods

In our research, we used a series of new substituted 1,2,4-triazole-3-thiols (*Fig. 1*), which were first synthesized in the laboratory of organic synthesis of the Department of Natural Sciences for foreign students and toxicological chemistry of Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University. Physical-chemical constants of the synthesized compounds have been studied and described before, some of them are given in the literature [1,10].

Previously, we conducted a study to determine the dose of synthesized compounds, we also studied the general toxic effect and acute toxicity of these derivatives. The research was carried out according to the well-known express method of V. B. Prozorovsky, and the assessment of the degree

of toxicity was determined by K. K. Sidorov. The animals were kept on a standard diet, under natural light regime “day and night” [12]. Further studies were performed taking into account the “Rules of preclinical safety assessment of pharmacological agents (GLP)” [13]. Acute toxicity studies of each compound were studied in a range of four doses, each of which was tested on 2 animals [14,16].

The follow-up period was 14 days, during which the nature and duration of symptoms of intoxication, the time of death, and the number of dead animals from each dose were taken into account [15,16]. The research was conducted in accordance with the national “General Ethical Principles of Animal Experiments” (Ukraine, 2001), which is consistent with the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, France, 1985).

To study the effect on renal function, 6 groups of animals with 7 rats in each were used. In the study of aqueous diuresis, rats were kept on a constant diet with free access to water. Prior to water loading (5 % of body weight), rats were kept for 2 h without food and water. All compounds studied were water-insoluble, so they were administered orally as an aqueous suspension stabilized with tween-80. The compounds were administered at a dose of 1/10 of LD₅₀.

The amount of urine was measured every hour for 4 hours. The amount of urine excreted by the control group of animals (which did not receive test compounds) was taken as 100 %. The study and analysis of the obtained experimental data were performed in comparison with the reference diuretics: hypothiazide and furosemide.

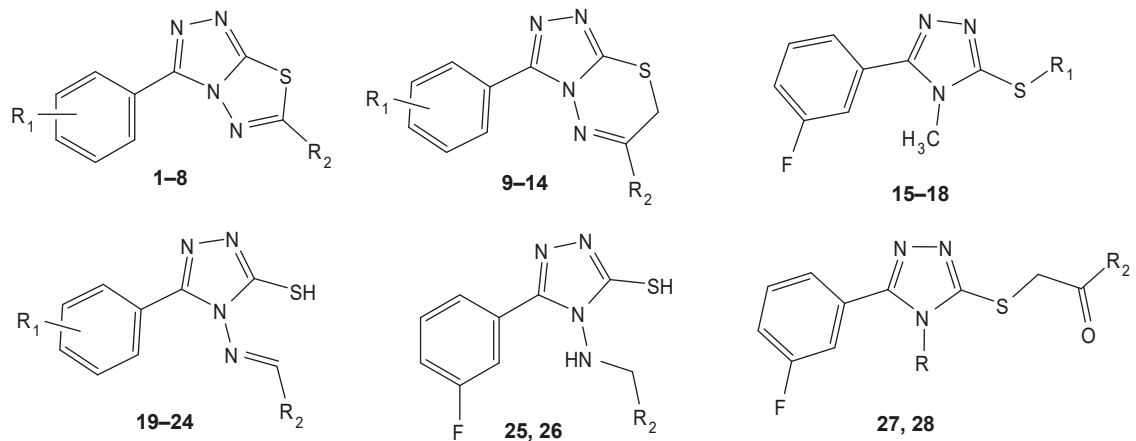
Results

Twenty-eight new compounds, including substituted 1,2,4-triazole-3-thiols belonging to different classes of compounds based on their chemical structure, were studied for their diuretic activity (*Fig. 1*).

Among the 3-(2-,3-fluorophenyl)-6-(aryl-,heteryl)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazoles, four exceed the reference diuretic hypothiazide (2, 4, 5, 6, *Table 1*), and 3-(2-fluorophenyl)-6-(phenyl)-[1,2,4]triazole[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazole (1), 3-(3-fluorophenyl)-6-(3-methoxyphenyl)-[1,2,4]triazole[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazole (7) and 3-(3-fluorophenyl)-6-(2-bromo-4-fluorophenyl)-[1,2,4]triazole[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazole (8) approximate by activity to furosemide. Regarding the activity of 3-(2-,3-fluorophenyl)-6-R₂-7H[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazines (9–14, *Table 1*), high rates of diuretic action were not detected.

Discussion

Analysis of the results of the diuretic activity of 3-alkylthio-5-(3-fluorophenyl)-4-methyl-1,2,4-triazoles (15–18, *Table 1*) shows a fairly high activity against hypothiazide, especially for 3-propylthio-5-(3-fluorophenyl)-4-methyl-1,2,4-triazole (15) and 3-hexylthio-5-(3-fluorophenyl)-4-methyl-1,2,4-triazole (18).



- 1) R₁ = 2-F, R₂ = phenyl; 2) R₁ = 2-F, R₂ = 2-fluorophenyl; 3) R₁ = 2-F, R₂ = 4-fluorophenyl; 4) R₁ = 2-F, R₂ = 2-methoxyphenyl;
 5) R₁ = 3-F, R₂ = phenyl; 6) R₁ = 3-F, R₂ = 2-methoxyphenyl; 7) R₁ = 3-F, R₂ = 3-methoxyphenyl; 8) R₁ = 3-F, R₂ = 2-bromo-4-fluorophenyl;
 9) R₁ = 2-F, R₂ = CH₃; 10) R₁ = 2-F, R₂ = 2-phenyl; 11) R₁ = 2-F, R₂ = 4-fluorophenyl; 12) R₁ = 2-F, R₂ = 4-methoxyphenyl;
 13) R₁ = 3-F, R₂ = CH₃; 14) R₁ = 3-F, R₂ = 4-methoxyphenyl; 15) R₁ = C₃H₇; 16) R₁ = C₄H₉; 17) R₁ = C₅H₁₁; 18) R₁ = C₆H₁₃;
 19) R₁ = 2-F, R₂ = phenyl; 20) R₁ = 2-F, R₂ = 4-bromophenyl; 21) R₁ = 2-F, R₂ = 3-fluorophenyl; 22) R₁ = 2-F, R₂ = 4-fluorophenyl;
 23) R₁ = 3-F, R₂ = 4-fluorophenyl; 24) R₁ = 3-F, R₂ = 2-hydroxyphenyl; 25) R₂ = 4-fluorophenyl; 26) R₂ = 2-hydroxyphenyl;
 27) R₁ = CH₃, R₂ = phenyl; 28) R₁ = NH₂, R₂ = phenyl

Fig. 1. Structure of some substituted 1,2,4-triazole-3-thiols.

Table 1. The results of the study of the diuretic activity of some substituted 1,2,4-triazole-3-thiols

No. connection	120 min, M ± m, ml	Δ % to control	240 min, M ± m, ml	Δ % to control
Control	1.330 ± 0.113	–	2.130 ± 0.117	–
Furosemide	4.0800 ± 0.0352*	186.07	6.050 ± 0.028*	188.77
Hypothiazide	2.710 ± 0.332*	83.12	3.610 ± 0.312*	77.18
1	3.660 ± 0.438*	96.08	6.110 ± 0.366*	137.18
2	2.770 ± 0.074*	72.54	5.590 ± 0.310*	94.33
3	2.090 ± 0.166	33.45	3.210 ± 0.208*	32.32
4	2.230 ± 0.484	54.17	4.870 ± 0.458*	96.28
Control	1.630 ± 0.159	–	2.740 ± 0.265	–
5	2.840 ± 0.088*	72.44	5.780 ± 0.209*	94.18
6	2.720 ± 0.187	73.22	5.750 ± 0.187	95.11
7	3.180 ± 0.344	96.09	6.170 ± 0.456	138.19
8	3.150 ± 0.445	96.12	6.130 ± 0.413	139.32
9	2.120 ± 0.222	17.17	3.280 ± 0.216	63.16
Control	1.330 ± 0.088	–	2.210 ± 0.249	–
10	2.130 ± 0.212*	43.77	4.210 ± 0.260*	73.13
11	1.540 ± 0.133*	3.35	3.110 ± 0.228	17.74
12	1.570 ± 0.214	15.54	2.420 ± 0.115	40.65
13	1.870 ± 0.175	33.54	3.300 ± 0.211*	31.55
14	3.240 ± 0.155	30.07	5.180 ± 0.319	69.21
15	4.110 ± 0.113	160.23	7.560 ± 0.221	162.16
Control	1.350 ± 0.172	–	2.520 ± 0.115	–
16	2.380 ± 0.609	53.85	4.750 ± 0.563	95.62

Cont. of table 1.

No. connection	120 min, M ± m, ml	Δ % to control	240 min, M ± m, ml	Δ % to control
17	1.870 ± 0.254	21.66	4.150 ± 0.432	98.28
18	2.690 ± 0.255	23.27	4.330 ± 0.417	100.15
19	2.220 ± 0.114	21.31	4.420 ± 0.113	96.41
20	1.450 ± 0.211	17.31	2.720 ± 0.477	12.63
21	2.120 ± 0.274*	47.87	4.720 ± 0.236*	124.11
22	2.620 ± 0.133*	46.46	4.380 ± 0.221	126.15
23	1.210 ± 0.019	11.18	3.230 ± 0.409	51.23
24	1.440 ± 0.113	12.19	3,770 ± 0.509	52.13
25	3.680 ± 0.0312*	182.02	5.470 ± 0.016*	186.25
26	2.630 ± 0.262	64.52	4.660 ± 0.233*	65.13
27	2.460 ± 0.218	62.11	4.520 ± 0.142	61.09
28	1.550 ± 0.172	7.63	3.050 ± 0.175	19.66

*: p < 0.05 in relation to control.

Molecules of 5-(2-,3-fluorophenyl)-4-(aryl-,heteryl)ylidene)amino-1,2,4-triazole-3-thiols (19–24, *Fig. 1*) consist of various functional substituents. Therefore, it is possible to assume with a certain probability that their activity depends on features of structure of substituents on amino group.

Thus, the introduction of a 3-fluorophenyl or 4-fluorophenyl substituent into the molecule leads to an increase in diuretic activity almost twice relative to hypothiazide (21, 22, *Table 1*). Of particular note is 5-(3-fluorophenyl)-4-(4-fluorophenylamino)-1,2,4-triazole-3-thiol (25, *Table 1*), whose diuretic activity is highest.

The obtained data were statistically processed using the standard software package Microsoft Office 2007 and Statistica for Windows 6.0. The significance of intergroup differences according to experimental data was established using Student's t-test. The level of statistical significance of differences in research results is p < 0.01. Analyzing the results of the experiment, it was found that some compounds that were studied in a number of new derivatives of 1,2,4-triazole-3-thiol, have a pronounced diuretic activity (*Table 1*).

Conclusions

1. The diuretic activity of a number of new 4- and 3-thio-substituted 1,2,4-triazoles with fluorophenyl fragments was studied for the first time.

2. A thorough analysis of the results of diuretic activity reveals several compounds with higher activity than hypothiazide, as well as a compound with greater activity than furosemide.

3. In some cases, certain patterns between the chemical structure of the molecules and their diuretic activity were observed.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Information about authors:

Bihdan O. A., PhD, Associate Professor of the Department of Clinical Pharmacy, Pharmacotherapy, Pharmacognosy and Pharmaceutical Chemistry, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0003-1611-7978](https://orcid.org/0000-0003-1611-7978)

Parchenko V. V., DSc, Professor of the Department of Natural Sciences for Foreign Students and Toxicological Chemistry, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0002-2283-1695](https://orcid.org/0000-0002-2283-1695)

Kyrychko B. P., DSc, Professor, Head of the Department of Surgery and Obstetrics, Poltava State Agrarian Academy, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0003-1463-5501](https://orcid.org/0000-0003-1463-5501)

Zvenyhorodska T. V., PhD, Associate Professor of the Department of Surgery and Obstetrics, Poltava State Agrarian Academy, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0002-4186-5700](https://orcid.org/0000-0002-4186-5700)

Romanina D. M., PhD, Associate Professor of the Department of Medicines Technology, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0003-3935-284X](https://orcid.org/0000-0003-3935-284X)

Відомості про авторів:

Бігдан О. А., канд. фарм. наук, доцент каф. клінічної фармації, фармакотерапії, фармакогнозії та фармацевтичної хімії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

Парченко В. В., д-р фарм. наук, професор каф. природничих дисциплін для іноземних студентів та токсикологічної хімії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

Киричко Б. П., д-р вет. наук, професор, зав. каф. хірургії та акушерства, Полтавський державний аграрний університет, Україна.

Звенігородська Т. В., канд. вет. наук, доцент каф. хірургії та акушерства, Полтавський державний аграрний університет, Україна.

Романіна Д. М., канд. фарм. наук, доцент каф. технології ліків, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

References

- [1] Bihdan, O. A., & Parchenko, V. V. (2017). Fizyko-khimichni vlastyivosti S-pokhidnykh 5-(3-ftorfenil)-4-amino-1,2,4-triazol-3-tiolu [Physical-chemical properties of 5-(3-fluorophenyl)-4-amino-1,2,4-triazole-3-thiol S-derivatives]. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*, 10(2), 135-140. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2017.2.103517>
- [2] Abdelazeem, A. H., Alqahtani, A. M., Omar, H. A., Bukhari, S. N. A., & Gouda, A. M. (2020). Synthesis, biological evaluation and kinase

- profiling of novel S-benzo[4,5]thiazolo[2,3-c][1,2,4]triazole derivatives as cytotoxic agents with apoptosis-inducing activity. *Journal of Molecular Structure*, 1219. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128567>
- [3] Parchenko, V. V. (2006). *Syntezy, fizyko-khimichni ta biolohichni vlastyivosti pokhidnykh 1,2,4-triazol-3-tionu, yaki mistiat yadro furanu* [Synthesis, physical, chemical, and biological properties of 1,2,4-triazol-3-thione derivatives, which contain furane cycle] (PhD dissertation). Zaporizhzhia State Medical University, Zaporizhzhia. [in Ukrainian].
- [4] Parchenko, V. V. (2011). Protyvirusna aktyvnist 1,2,4-triazolu [Antiviral activity of 1,2,4-triazole]. *Farmatsevtychnyi zhurnal*, (3), 49-53. [in Ukrainian].
- [5] Pruhlo, Ye. S. (2019). *Syntezy ta biolohichni vlastyivosti 3-S-zamishchenykh 5-Alk, -Ar, -Het-4(H)-R-1,2,4-triazolu* [Synthesis and biological properties of 3-S-substituted 5-Alk, -Ar, -Het-4(H)-R-1,2,4-triazole] (Doctoral dissertation). Zaporizhzhia State Medical University, Zaporizhzhia. [in Ukrainian].
- [6] Danilchenko, D. M., & Parchenko, V. V. (2017). Antimicrobial activity of new 5-(furan-2-yl)-4-amino-1,2,4-triazole-3-thiol derivatives. *Zaporozhye medical journal*, 19(1), 105-107. <https://doi.org/10.14739/2310-1210.2017.1.91735>
- [7] Fortis-combi [website]. www.fortis-combi.com
- [8] Zvenihorodska, T., Hotsulia, A., Kravchenko, S., Fedotov, S., & Kyrychko, B. (2021). Synthesis and antimicrobial action of 1,2,4-triazole derivatives containing theophylline and 1,3,4-thiadiazole fragments in their structure. *African Journal of Biomedical Research*, 24(1), 159-163.
- [9] Parchenko, V. V. (2014). *Syntezy, peretvorennia, fizyko-khimichni ta biolohichni vlastyivosti v riadi 5-furylzamishchenykh 1,2,4-triazol-3-tioniv* (Dis. dokt. farm. nauk) [Synthesis, transformation, physico-chemical and biological properties in the number of 5-furylsubstituted 1,2,4-triazole-3-thiones (Doctoral dissertation)]. Zaporizhzhia State Medical University, Zaporizhzhia. [in Ukrainian].
- [10] Fedotov, S., Gotsulya, A., Zaika, Y., & Brytanova, T. (2023). Design, synthesis and molecular docking of some derivatives of 9-methylpyrazolo[1,5-d][1,2,4]triazolo[3,4-f][1,2,4]triazine-3-thiol. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 47(2). <https://doi.org/10.33483/jfpau.1180794>
- [11] Bihdan, O. A., & Parchenko, V. V. (2018). Some aspects of synthesis 3-(2-florphenyl)-6-R1-[1,2,4]triazol[3,4-b][1,3,4]thiadiazole and 3-(2-, 3-florphenyl)-6-R2-7H[1,2,4]triazolo[1,3,4]tiadiazines. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 9(3), 463-470.
- [12] Shcherbyna, R. O., Danilchenko, D. M., Parchenko, V. V., Panasenko, O. I., Knysh, Ye. H., & Luholat, Yu. V. (2017). Studying of 2-((5-R-4-R1-4H-1,2,4-triazole-3-yl)thio)acetic acid salts influence on growth and progress of blackberries (KIOWA variety) propagules. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 8(3), 975-979.
- [13] Stefanov, O. V. (2001). *Doklinichni doslidzhennia likarskykh zasobiv* [Preclinical studies of drugs. Guidelines]. Kyiv: Avitsena. [in Ukrainian].
- [14] Friedman, L. M., Furberg, C. D., & DeMets, D. L. (2010). *Fundamentals of Clinical Trials*. Springer Science & Business Media.
- [15] Zakotei, M. (2001). Laboratornaya praktika v Ukraine budet nadlezhashchei [Laboratory practice in Ukraine will be appropriate]. *Provizor*, (11). [in Russian]. https://www.provisor.com.ua/archive/2001/N11/art_05.php?part_code=45&art_code=2578
- [16] Drogovoz, S. M., Zupanets, I. A., Bezdetko, N. V., Ryzhenko, I. M., Kuznetsova, N. L., & Yakovleva, L. V. (1994). *Farmakologiya* [Pharmacology]. Kharkov: Osnova. [in Russian].



Застосування Тіоцетаму в комплексній терапії бойової контузії головного мозку

І. Ф. Беленічев^{1,2,3,A,F}, К. Ю. Нерянов^{1,3,B,C}, В. І. Черній^{1,A,F}, Д. А. Серета^{1,3,C},
Л. І. Кучеренко^{1,2,3,A,C}, Н. В. Дерев'янка^{1,2,D,E}, К. І. Кандибей^{1,2,B,E}

¹ДНУ «Науково-практичний центр профілактичної та клінічної медицини» ДУС, м. Київ, Україна, ²Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна, ³ТОВ НВО «Фарматрон», м. Запоріжжя, Україна

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті;
F – остаточне затвердження статті

При гострій мозковій ішемії, що спричинена черепно-мозковою травмою (ЧМТ), кожен хворий є унікальним випадком зі своїми особливостями та проблемами.

Мета роботи – вивчення застосування Тіоцетаму в комплексній терапії бойової контузії головного мозку та оцінювання його терапевтичної дії в пацієнтів із легкою та середньотяжкою закритою бойовою черепно-мозковою травмою порівняно з базисною терапією.

Матеріали та методи. Обстежили 79 хворих із легкою та середньотяжкою закритою бойовою черепно-мозковою травмою. У 76 осіб ЧМТ спричинена мінно-вибуховою травмою; діагностували струс головного мозку, забій головного мозку легкого ступеня, перелом склепіння черепа. Хворі надходили до відділення в гострому періоді. Під час дослідження використано клінічні та функціональні методи оцінювання стану центральної нервової системи. Проаналізовано результати комплексного лікування.

Результати. Застосування Тіоцетаму не спричинило підвищення збудливості, нервозності, порушення сну в пацієнтів. Проаналізували вегетативну реактивність після лікування Тіоцетамом. Встановили, що показник нормальної вегетативної реактивності збільшився до 60 %, а в контрольній групі – до 42 %. Показники пацієнтів із підвищеною вегетативною реакцією зменшилися з 42,8 % до 17,9 %, у контрольній групі – з 38,5 % до 23,1 %. Позитивний клінічний ефект в основній групі пацієнтів, які отримували Тіоцетам, спостерігали у 94 % випадків у перші 5 днів. У контрольній групі позитивний клінічний ефект визначили в 76 % випадків. Поліпшення виявили і в клінічній сфері, і за показниками вегетативної реактивності ЕЕГ, шкали дослідження когнітивних функцій MMSE.

Висновки. Застосування Тіоцетаму в гострому періоді легкої та середньотяжкої закритої бойової черепно-мозкової травми підвищує нейропротективну дію базисної терапії. Поєднання ноотропного й нейропротекторного ефектів, що властиві комбінованому препарату Тіоцетам, дає змогу істотно зменшити або уникнути побічних дій, характерних для традиційних рацетамних ноотропів.

Ключові слова: ноотропні засоби, травми головного мозку, оксидативний стрес, нейропротекторні засоби, контузії, когнітивні функції.

Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2023. Т. 16, № 2(42). С. 170-174

The use of Thiocetam in the complex therapy of combat-related brain contusion

I. F. Bielenichev, K. Yu. Nerianov, V. I. Chernii, D. A. Sereda, L. I. Kucherenko, N. V. Derevianko, K. I. Kandybei

Each patient presents a unique set of characteristics and challenges when it comes to acute cerebral ischemia resulting from cranio-cerebral injury.

The aim of this study is to investigate the utilization of Thiocetam as part of a comprehensive treatment approach for combat-related cerebral contusion and to assess the therapeutic effects of Thiocetam in patients with mild and moderate closed combat craniocerebral trauma in comparison to standard basic therapy.

Materials and methods. 79 patients with mild and moderate closed combat craniocerebral trauma were examined. Among them, 76 patients experienced craniocerebral trauma due to an explosive blast injury, which included conditions such as brain concussion, mild cerebral contusion, and cranial vault fractures. All patients were admitted to the department during the acute period of their injuries.

During the study, various clinical and functional methods were employed to assess the condition of the central nervous system. These methods were used to evaluate the effects of the complex treatment administered to the patients.

ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/281460>

UDC 616.831-001.31-02:355.422]-085.27.015
DOI: [10.14739/2409-2932.2023.2.281460](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2023.2.281460)

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(2), 170-174

Key words: nootropic agents, brain injuries, oxidative stress, neuroprotective agents, contusions, cognitive function.

*E-mail: natalia.parniuk@gmail.com

Received: 18.05.2023 // Revised: 31.05.2023 // Accepted: 14.06.2023

Results. The administration of Thiocetam to the patients did not result in an increase in excitability, nervousness, or sleep disturbances. Furthermore, the examination of autonomic reactivity following Thiocetam treatment revealed that the indicator of normal autonomic reactivity increased to 60 % in the treated group, whereas it only increased to 42 % in the control group. Additionally, the patients with initially heightened vegetative reactions experienced a decrease from 42.8 % to 17.9 % in the treated group, while the control group saw a decrease from 38.5 % to 23.1 %. In terms of clinical outcomes, a positive effect was observed in 94 % of patients in the Thiocetam-treated group within the first 5 days. In comparison, the control group showed a positive clinical effect in 76 % of cases. This improvement was evident both in the clinical field and based on indicators of autonomic reactivity in EEG data, as well as cognitive function assessed by the MMSE cognitive function test scale.

Conclusions. The utilization of Thiocetam during the acute phase of mild and moderate closed combat craniocerebral trauma enhances the neuroprotective effects of basic therapy. The combined drug Thiocetam, which possesses both nootropic and neuroprotective effects, offers the advantage of reducing or even avoiding the side effects commonly associated with traditional racetam nootropics.

Key words: nootropic agents, brain injuries, oxidative stress, neuroprotective agents, contusions, cognitive function.

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(2), 170-174

Згідно з даними ВООЗ, у світі щороку черепно-мозкові травми (ЧМТ) виявляють у більш ніж у 10 млн осіб, із них 250–300 тис. постраждалих вмирають. У Європі ЧМТ є основною причиною смерті хворих віком менше ніж 35 років. Останнім часом частота ЧМТ в Україні у різних регіонах становила 2,3–6,0 %, у середньому – 4,0–4,2 %, тобто виникала у 200 тис. осіб протягом року. Майже кожні 10–15 років частота ЧМТ зростає приблизно вдвічі [1–3].

ЧМТ характеризується значною поширеністю, показники якої неухильно зростають. Найчастіше ЧМТ діагностують в осіб молодого та середнього віку (20–50 років), тобто в найбільш працездатний період. Останніми роками у великих промислових регіонах країни травматизм набуває епідемічного характеру.

Наведені факти, а також різноманітність клінічних проявів і тяжкості перебігу ЧМТ зумовлюють необхідність розроблення стратегій науково обґрунтованих підходів до її патогенетичного лікування, що ґрунтується на вивченні різних аспектів її патогенезу [4–6].

Актуальність проблеми лікування ЧМТ та її наслідків пов'язана зі значними економічними втратами, а також високими показниками інвалідизації (10–12 % постраждалих).

У патогенезі ЧМТ важливу роль відіграють вторинні пошкодження тканини головного мозку, передусім церебральна ішемія, внаслідок чого формуються порушення енергетичного метаболізму, вуглеводного обміну, гіперактивація вільнорадикальних процесів, що ініціюють процеси переокиснення [7,8]. Вивчення особливостей перебігу патофізіологічних процесів цереброваскулярних розладів (і гострих, і хронічних) та травматичного пошкодження мозку показало: в основі поширення порушень цілісності клітин і руйнування тканин при різних формах внутрішньочерепних гематом – механізми апоптозу або некрозу [9].

Сучасна медицина має великий асортимент лікарських засобів для лікування та запобігання наслідкам ЧМТ, але не всі препарати відповідають сучасним вимогам. Тому пошук і розроблення нових високоефективних, безпечних засобів фармакологічного захисту мозку, що відрізняються політропністю фармакодинамічних ефектів, спрямованих на одночасну корекцію різних ланок пато-

генезу ЧМТ, – один із пріоритетних напрямів розвитку фундаментальної та клінічної медицини.

Нині на фармацевтичному ринку України є чимало препаратів із нейропротекторними властивостями, але немає можливості здійснити мультицентрові рандомізовані плацебо-контрольовані дослідження цих нейропротекторів. При гострій мозковій ішемії, що спричинена ЧМТ, кожен хворий є унікальним випадком зі своїми особливостями та проблемами [10–12].

Перспективним може бути застосування церебропротективного препарату, який є комбінацією пірацетаму з тіотріазоліном (Тіоцетам). Імовірно, його можна й треба застосовувати в усі періоди перебігу ЧМТ, але ефект може бути дозозалежним.

Мета роботи

Вивчення застосування Тіоцетаму в комплексній терапії бойової контузії головного мозку та оцінювання його терапевтичної дії в пацієнтів із легкою та середньотяжкою закритою бойовою черепно-мозковою травмою порівняно з базисною терапією.

Матеріали і методи дослідження

В одній із лікарень м. Запоріжжя обстежили 79 хворих із легкою та середньотяжкою закритою бойовою черепно-мозковою травмою (13–15 балів за шкалою ком Глазго (ШКГ)). Вік хворих становив від 23 до 55 років. У більшості випадків (n = 76) ЧМТ спричинена мінно-вибуховою травмою.

Клінічно більшість ЧМТ виявляли як струс головного мозку – 67 випадків; у 12 пацієнтів діагностували забій головного мозку легкого ступеня, у 2 випадках – переломи склепіння черепа. Всі хворі надходили до нейрохірургічного відділення в гострому періоді (1–3 доби з моменту поранення). Зазначимо, що у 100 % випадків ЧМТ поєднана з акубаротравмою.

Під час лікування пацієнтів використовували розчин Тіоцетаму 10 мл виробництва АТ «Галичфарм».

Застосували клінічні та функціональні методи оцінювання стану центральної нервової системи. Так, здійснили клінічне та неврологічне обстеження, виконали електроенцефалографію (ЕЕГ), застосували метод

систематизації, класифікації та кодування електроенцефалограм людини, виконали топографічне картування електроенцефалограми з розрахунком спектральної потужності та когерентності, використали методи інтегрального кількісного аналізу ЕЕГ та нейромережевого моделювання, здійснили ультразвукове доплерографічне дослідження судин мозку.

Інтрацеребральні заходи, що вжиті в 1, 2 і 3 періодах травматичної хвороби головного мозку (ТХГМ), – аналігоседація; мембраностабілізація та первинна нейропротекція; усунення церебрального вазоспазму; покращення венозного відтоку з порожнини черепа; профілактика та лікування набряку та набухання головного мозку; відновлення енергетичного дефіциту нервової тканини та вторинна нейропротекція; відновлення нейромедіаторного обміну та вторинна нейропротекція. Інтрацеребральні заходи, що вжиті в 4 періоді ТХГМ, – нейрореабілітація, нейромедіаторна та нейротрофічна терапія.

Надалі аналізували результати комплексного лікування, що передбачало застосування Тіоцетаму, в 39 поранених із легкою та середньотяжкою закритою бойовою ЧМТ. Група контролю – 40 пацієнтів, яким призначали стандартну терапію. Хворих рандомізували на основну та контрольну групу, враховуючи тяжкість ЧМТ, вік і супутню патологію. Тіоцетам вводили протягом 5 днів внутрішньовенно крапельно з першої доби надходження пацієнтів у відділення нейрореанімації в середній дозі 0,2–0,3 мл/кг на 150 мл фізіологічного розчину протягом години.

Первинний критерій для оцінювання нейропротективної дії комбінованої терапії, що включала розчин для парентерального застосування Тіоцетам, у гострому періоді ЧМТ – нейрон-специфічна енолаза (NSE) як специфічний маркер у сироватці крові пацієнтів. Крім того, в сироватці крові визначали білок S-100, що належить до класу нейромаркерів і відбиває активність нейроглиї як закономірну відповідь на масивне руйнування нейронів. Отже, вивільнення ферменту та білка з нейронів у кров – маркер ушкодження нервової тканини.

Активність NSE (нг/мл) і вміст S-100 (нг/мл) визначали методом твердофазного імуоферментного аналізу, використовуючи набори NSE, Elisa kit #ab217778 (ABCAM, USA) та S-100 Elisa kit #LS-F6208 (LifeSpan Biosciences Inc., USA).

Як маркер оксидативного стресу та для оцінювання антиоксидантної дії комплексної терапії, що включала Тіоцетам, у сироватці визначали нітритрозин методом твердофазного імуоферментного аналізу, застосовуючи набори Nitrotyrosine, Elisa kit #HK501 (Hycult Biotech, USA). Дослідження здійснили на мікропланшетному імуоферментному рідері Sirio-S (Seac Radim Company, Італія).

Результати дослідження аналізували, застосовуючи програму Statistica® for Windows 13.0 (StatSoft Inc., № JPZ804I382130ARCN10-J), а також SPSS 16.0, Microsoft Office Excel 2003. Нормальність розподілу оцінювали за критерієм Shapiro–Wilk. Дані наведено

як середнє значення та похибку середнього, а також як абсолютні значення та відсотки. Достовірність різниці між середніми значеннями визначали за критерієм Стьюдента, якщо розподіл даних відповідав нормальному закону. Якщо розподіл даних не відповідав нормальному закону, а також під час аналізу порядкових змінних використовували критерій U Mann–Whitney. Для порівняння незалежних змінних у більш ніж двох вибірках застосували дисперсійний аналіз (ANOVA) при нормальному розподілі, критерій Kruskal–Wallis – для розподілу, що відрізнявся від нормального. Для всіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$ (95 %).

Результати

Дані, що одержали, свідчать про порівняно ранній регрес суб'єктивних симптомів стресу головного мозку та забиття середнього ступеня в постраждалих із закритою бойовою ЧМТ основної групи порівняно з пацієнтами контрольної групи. Так, після 5 діб 9 % осіб мали скарги на періодичний помірний головний біль, а в контрольній групі – 20 % поранених. Помірно виражені астеничні й когнітивні порушення після 5 діб зафіксували в 9,7–14,3 % пацієнтів основної групи, у контрольній – у 18,0–27,0 % випадків. Зазначимо, що раннє застосування Тіоцетаму в основній групі пацієнтів (починаючи з другої доби) не спричиняло підвищення збудливості, нервозності, порушення сну, тобто симптоми, що характерні для приймання високих доз рацетамних ноотропів (пірацетам, фенотропіл, прамістар, оксирацетам, аніпацетам тощо).

У результаті дослідження вегетативної реактивності після лікування препаратом Тіоцетам порівняно з контрольною групою виявили: цей показник підвищився до 60 %, а в контрольній групі – до 42 %. У пацієнтів із підвищеною вегетативною реакцією зафіксували зниження показників із 42,8 % до 17,9 %, у контрольній групі – з 38,5 % до 23,1 %.

Позитивний клінічний ефект в основній групі пацієнтів, які отримували Тіоцетам, спостерігали у 94 % випадків у перші 5 днів. У контрольній групі позитивний клінічний ефект виявили у 76 % випадків. Поліпшення спостерігали й у клінічній сфері, за даними вегетативної реактивності ЕЕГ, результатами шкали дослідження когнітивних функцій MMSE.

Побічні реакції та ознаки непереносності препарату не зафіксували в жодного пацієнта протягом усього спостереження у клініці.

Обговорення

За результатами лабораторних досліджень, у крові пацієнтів із легкою та середньотяжкою закритою ЧМТ (13–15 балів за ШКГ) у гострий період активність маркера мембранної цілісності нейронів NSE достовірно підвищена щодо відносно здорових осіб. Це свідчить про суттєву деструкцію нейронів і превалювання некро-

Таблиця 1. Концентрація маркерів нейродеструкції нейронспецифічної енолази (NSE), білка S-100 і маркера оксидативного стресу нітритирозину в крові пацієнтів після бойової ЧМТ легкого і середнього ступенів тяжкості та 5-добової комбінованої терапії

Групи пацієнтів	NSE, нг/мл	S-100, нг/мл	Нітритирозин, нг/мл
Відносно здорові, n = 15	0,210 ± 0,024	0,120 ± 0,007	0,870 ± 0,035
ЧМТ під час надходження, n = 79	6,87 ± 0,16	0,67 ± 0,04	11,4 ± 0,57
ЧМТ + базисна терапія, n = 40	5,12 ± 0,18* -25,5 %	0,49 ± 0,03# -26,8 %	8,83 ± 0,43# -22,5 %
ЧМТ + базисна терапія + Тіоцетам, n = 39	4,72 ± 0,12** -31,3 %	0,37±0,005** -44,7 %	5,27 ± 0,09** -53,7 %

#: $p < 0,05$ щодо показників під час надходження; *: $p < 0,05$ щодо показників пацієнтів із ЧМТ, які одержували базисну терапію.

тичного типу їх загибелі. Рівень іншого маркера, білка S-100, що відбиває активність астроцитарної глії, зміна якої є закономірною відповіддю нервової тканини на некротичні та некробіотичні процеси, значно зріс щодо значень умовно здорових людей.

Ці дані свідчать про первинне ураження масиву нейронів після травми. Крім того, у крові пацієнтів з легкою та середньотяжкою закритою бойовою черепно-мозковою травмою зросла концентрація нітритирозину, що свідчить про активацію оксидативного стресу.

Додавання Тіоцетаму до базисної терапії ЧМТ призводило до зниження нейромаркерів, зокрема S-100 на 44,7 % щодо показників на час надходження ($p < 0,05$). Базисна терапія без Тіоцетаму спричиняла зниження S-100 на 26,8 % ($p < 0,05$). У разі призначення Тіоцетаму як додаткового засобу до базисної терапії спостерігали зниження NSE на 31,3 % щодо рівня на час надходження ($p < 0,05$).

Базисна терапія без Тіоцетаму призводила до зниження NSE на 25,0 % ($p < 0,05$). Курсове призначення Тіоцетаму в комплексі базисної терапії ЧМТ сприяє зниженню маркера оксидативного стресу нітритирозину на 53,7 % порівняно з показником на час надходження ($p < 0,05$). Базисна терапія ЧМТ без Тіоцетаму знижує рівень нітритирозину на 22,5 % ($p < 0,05$).

Ці дані свідчать про підвищення нейропротективної й антиоксидантної активностей засобів базисної терапії в разі додавання до неї Тіоцетаму (табл. 1).

Висновки

1. Застосування Тіоцетаму (5 днів, в/в, 0,2–0,3 мл/кг на 150 мл фізіологічного розчину) в комплексному лікуванні легкої та середньотяжкої закритої черепної травми, зокрема бойової ЧМТ (79 пацієнтів) призводило до поліпшення і в клінічній сфері (позитивний ефект у 94 % випадках, у контролі – 76 %), і за показниками вегетативної реактивності ЕЕГ, шкали дослідження когнітивних функцій MMSE. Додавання Тіоцетаму до комплексного лікування ЧМТ спричиняло зниження нейромаркерів S-100 (на 44,7 %) і NSE (на 31,3 %), маркера оксидативного стресу нітритирозину (на 53,7 %) ($p < 0,05$). Значення молекулярних маркерів у групі пацієнтів, які отримували Тіоцетам, вірогідно відрізнялися від контролю. Отже, комплексне клінічне та нейрофізіологічне дослідження показало

доцільність і обґрунтованість застосування Тіоцетаму в гострому періоді легкої та середньотяжкої закритої черепно-мозкової травми, зокрема бойової (13–15 балів за ШКГ), оскільки воно виявилось патогенетично обґрунтованим.

2. Призначення Тіоцетаму в гострому періоді легкої та середньотяжкої закритої бойової черепно-мозкової травми підвищує нейропротективну дію базисної терапії, гальмує оксидативний стрес, сприяє ранньому усуненню неврологічного дефіциту та відновленню когнітивних функцій.

3. Результати дослідження клінічно обґрунтовують перспективність додавання Тіоцетаму як нейропротектора до базисної терапії закритої бойової ЧМТ. Поєднання ноотропного та нейропротекторного ефектів, що притаманні комбінованому препарату Тіоцетам (пірацетам + тіотріазолін), дає змогу істотно зменшити або уникнути побічних дій, що характерні для традиційних рацетамних ноотропів.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Відомості про авторів:

Беленічев І. Ф., д-р біол. наук, професор, зав. каф. фармакології та медичної рецептури з курсом нормальної фізіології, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0003-1273-5314

Нерянов К. Ю., канд. мед. наук, доцент, ТОВ НВО «Фарматрон», м. Запоріжжя, Україна.

ORCID ID: 0009-0006-8607-6533

Черній В. І., професор, ДНУ «Науково-практичний центр профілактичної та клінічної медицини» Державного управління справами, м. Київ, член-кореспондент Національної академії медичних наук України.

ORCID ID: 0000-0002-9885-9248

Середа Д. А., лікар-нейрохірург вищої категорії, ТОВ НВО «Фарматрон», м. Запоріжжя, Україна.

ORCID ID: 0009-0001-1153-1910

Кучеренко Л. І., д-р фарм. наук, професор, зав. каф. фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет; ТОВ НВО «Фарматрон», м. Запоріжжя, Україна.

ORCID ID: 0000-0003-2229-0232

Дерев'яно Н. В., канд. фарм. наук, старший викладач каф. фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0003-3349-867X

Кандибей К. І., канд. фарм. наук, доцент каф. фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.
ORCID ID: 0000-0001-7131-2704

Information about authors:

Bielenichev I. F., PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Pharmacology and Medical Formulation with Course of Normal Physiology, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

Nerianov K. Yu., MD, PhD, Associate Professor, LLC SPA "Pharmatron", Zaporizhzhia, Ukraine.

Chemii V. I., Professor, State Scientific Institution "Scientific and Practical Center of Preventive and Clinical Medicine" of the State Administration of Affairs, Kyiv, Corresponding member of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine.

Sereda D. A., Neurosurgeon of the Highest Category, LLC SPA "Pharmatron", Zaporizhzhia, Ukraine.

Kucherenko L. I., PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Pharmaceutical, Organic and Bioorganic Chemistry, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, LLC SPA "Pharmatron", Ukraine.

Derevianko N. V., PhD, Senior Lecturer of the Department of Pharmaceutical, Organic and Bioorganic Chemistry, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

Kandybei K. I., PhD, Associate Professor of the Department of Pharmaceutical, Organic and Bioorganic Chemistry, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

References

- Chernii, V. I., Andronova, M. A., Chernii, T. V., & Andronova, I. A. (2016). Doslidzhennia khronichnoi ishemii mozku za dopomohoiu metodu kilkisnoi elektroentsefalografii [Study of chronic brain ischemia using the method of quantitative electroencephalography]. *Zhurnal nevrologii im. B. M. Mankovskoho*, 4(3), 43-49. [in Ukrainian].
- Chernii, V. I., Chernii, T. V., & Andronova, I. A. (2019). Suchasni mozhlyvosti ta perspektyvy intensyvnoi terapii khvorykh iz hystrym ishemichnym insultom v Ukraini [Modern opportunities and prospects intensive therapy of patients with acute ischemic stroke in Ukraine]. *Zhurnal nevrologii im. B. M. Mankovskoho*, 7(2), 5-14. [in Ukrainian].
- Chernii, T., Fokina, D., & Chernii, V. (2020). Kompleksne likuvannia khvorykh z khronichnoi ishemieiu mozku. Tsilespryamovana korektsiia kohnityvnykh porushen ta vidnovlennia rukhovykh funktsii pislia perenesenoho mozkovoho insultu [Comprehensive treatment of patients with chronic brain ischemia. Purposeful correction of cognitive impairment and recovery of motor functions after a stroke]. *Klinichna ta profilaktychna medytsyna*, 4(14), 33-43. [in Ukrainian]. [https://doi.org/10.31612/2616-4868.4\(14\).2020.02](https://doi.org/10.31612/2616-4868.4(14).2020.02)
- Chernii, V. I., & Chernii, T. V. (2021). Suchasni pryntsyipy diahnozyky y likuvannia tiazhkoi cherepno-mozkovoï travmy [Modern principles of diagnosis and treatment of severe traumatic brain injury]. *Emergency medicine*, 17(5), 6-12. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.22141/2224-0586.17.5.2021.240700>
- Belenichev, I. F., Chekman, I. S., Nagornaya, E. A., Gorbacheva, S. V., Gorchakova, N. A., Bukhtiyarova, N. V., Reznichenko, N. Yu., & Feroz Shakh. (2020). *Tiol-disulfidnaya sistema: rol v endogennoi tsito- i organoproteksii, puti farmakologicheskoi modulyatsii* [Thiol-Disulfide System: Role in Endogenous Cyto- and Organoprotection, Pathways of Pharmacological Modulation]. Kyiv : Yuston. [in Russian].
- Belenichev, I., Kucherenko, L., Pavlov, S., Bukhtiyarova, N., Popazova, O., Derevianko, N., & Nimenko, G. (2022). Therapy of post-COVID-19 syndrome: improving the efficiency and safety of basic metabolic drug treatment with tiazotic acid (thiothiazoline). *Pharmacia*, 69(2), 509-516. <https://doi.org/10.3897/pharmacia.69.e82596>
- Reznichenko, Yu. H., Reznichenko, H. I., Borzenko, Yu. V., Smilian, O. I., Reznichenko, N. Yu., Bielenichev, I. F., Horchakova, H. O., Ryzhenko, O. I., & Siusiuka, V. H. (2020). *Perynatalni urazhennia nervovoi systemy* [Perinatal lesions of the nervous system]. Zaporizhzhia: Prosvita; 2020. [in Ukrainian].
- Belenichev, I., Gorchakova, N., Kuchkovskiy, O., Ryzhenko, V., Varavka, I., Varvanskyi, P., & Gorova, E. (2022). Pryntsyipy metabolitotropnoi terapii u pediatrichnii praktytsi. Kliniko-farmakologichna kharakterystyka suchasnykh metabolitotropnykh zasobiv (chastyna 1) [Principles of metabolithotropic therapy in pediatric practice. Clinical and pharmacological characteristics of modern metabolithotropic agents (part 1)]. *Fitoterapiia. Chasopys*, (3), 6-26. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.33617/2522-9680-2022-3-6>
- Belenichev I., Gorchakova N., Kuchkovskiy O., Ryzhenko V., Varavka I., Varvanskyi P., & Gorova E. (2022). Pryntsyipy metabolitotropnoi terapii u pediatrichnii praktytsi. Kliniko-farmakologichna kharakterystyka suchasnykh metabolitotropnykh zasobiv (chastyna 2). [Principles of metabolithotropic therapy in pediatric practice. Clinical and pharmacological characteristics of modern metabolithotropic agents (part 2)]. *Fitoterapiia. Chasopys*, (4), 30-54. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.33617/2522-9680-2022-4-30>
- Stammet, P. (2017). Blood Biomarkers of Hypoxic-Ischemic Brain Injury after Cardiac Arrest. *Seminars in neurology*, 37(1), 75-80. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1593858>
- Welch, R. D., Ellis, M., Lewis, L. M., Ayaz, S. I., Mika, V. H., Millis, S., & Papa, L. (2017). Modeling the Kinetics of Serum Glial Fibrillary Acidic Protein, Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolase-L1, and S100B Concentrations in Patients with Traumatic Brain Injury. *Journal of neurotrauma*, 34(11), 1957-1971. <https://doi.org/10.1089/neu.2016.4772>
- Thelin, E. P., Nelson, D. W., & Bellander, B. M. (2017). A review of the clinical utility of serum S100B protein levels in the assessment of traumatic brain injury. *Acta neurochirurgica*, 159(2), 209-225. <https://doi.org/10.1007/s00701-016-3046-3>



Мікροхірургічне кліпування як метод профілактики повторного розриву аневризми передньої сполучної артерії

I. O. Shkil *

КНП «Запорізька обласна клінічна лікарня» ЗОР, Україна

Мета роботи – оцінити ефективність мікροхірургічного кліпування аневризми передньої сполучної артерії (ПСА) як методу профілактики повторного розриву аневризми.

Матеріали та методи. У 98 хворих діагностували аневризми ПСА. Вік пацієнтів з аневризмами ПСА – від 20 до 72 років (середній вік – $47,8 \pm 11,0$ року). Співвідношення жінок і чоловіків – 1,04 : 1,00. Аневризми верифікували за допомогою комп'ютерної томографії судин голови та шиї, селективної церебральної ангіографії, МРТ-ангіографії судин головного мозку.

Результати. Під час мікροхірургічного лікування всіх пацієнтів, залучених у дослідження, використали птеріональний доступ. У перші три доби від розриву аневризми здійснили мікροхірургічне лікування 18 найтяжчим пацієнтам. Після трьох діб і пізніше хірургічне втручання виконали пацієнтам із компенсованим і субкомпенсованим станом, надалі хворих дообстежили з ретельним плануванням мікροхірургічної тактики. Наявність компресії мозку, вираженої дислокації, оклюзійної гідроцефалії – показання до екстреної операції. Ангіоспазм виявили у 45 (45,9 %) пацієнтів: виражений – у 36 %, поширений – у 20 %. Внутрішньомозкові гематоми зафіксували в 30 (30,6 %) хворих, внутрішньошлуночкові крововиливи – у 28 (28,6 %). У п'яти випадках внутрішньомозкові гематоми призводили до вираженої компресії головного мозку та дислокації серединних структур, тому здійснили видалення гематом і кліпування аневризми.

У 50 % пацієнтів із внутрішньошлуночковими крововиливами наявні також внутрішньомозкові гематоми лобних долей, а кров найчастіше локалізувалась у кількох шлуночках. Перед кліпуванням аневризми 4 хворим із декомпенсованою гідроцефалією здійснили вентрикуло-дренувальні та лікворо-шунтувальні операції. Післяопераційна летальність у цій групі пацієнтів становила 11 %, рівень вираженого неврологічного дефіциту – 22 %.

Встановили, що повторні розриви аневризм ПСА після надходження в стаціонар виникли у 15 % пацієнтів, які перебували на лікуванні.

Висновки. Мікροхірургічне лікування забезпечує малоінвазивний підхід, який мінімізує пошкодження навколишньої тканини мозку. Це допомагає зберегти функцію мозку та мінімізувати ризик післяопераційних неврологічних ускладнень.

Ключові слова: аневризми ПСА, повторний розрив аневризми, кліпування.

Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2023. Т. 16, № 2(42). С. 175-180

Microsurgical clipping of anterior communicating artery aneurysms as a method of prevention of repeated aneurysm rupture

I. O. Schkil

The aim of this study is to evaluate the efficacy of microsurgical clipping of anterior communicating artery (ACoM) aneurysms as a method of prevention of repeated aneurysm rupture.

Materials and methods. A total of 98 patients were included in the study, with a mean age of 47.8 ± 11.0 years. The female-to-male ratio was 1.04 : 1.00. Aneurysms were verified using computer tomography of the head and neck vessels, selective cerebral angiography, and MRI angiography of cerebral vessels.

Results. Pterional access was used for surgical intervention in all patients. In the first three days after the aneurysm rupture, microsurgical treatment was performed on 18 of the most severe patients. After three days and later, surgical intervention was performed in patients with compensated and sub-compensated conditions. Patients were further examined; microsurgical tactics were carefully planned. Brain compression, pronounced dislocation, and occlusive hydrocephalus were indications for emergency surgery. Angiospasm was detected in 45 patients (45.9 %), among them pronounced angiospasm was detected in 36 %, widespread – in 20 %, intracerebral hematomas – in 30 (30.6 %), intraventricular hemorrhages – in 28 (28.6 %). In five cases, intracerebral hematomas led to pronounced compression of the brain and dislocation of the middle structures. These patients underwent hematoma removal and aneurysm clipping. Half of the patients had simultaneous intraventricular hemorrhages and intracerebral hematomas of the frontal lobes and the blood was most often localized in several ventricles. Four patients with decompensated hydrocephalus underwent ventricular drainage and

ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/278867>

UDC 616-089.819:616.133.331-007.64-007.43-039.35-084

DOI: [10.14739/2409-2932.2023.2.278867](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2023.2.278867)

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(2), 175-180

Key words: anterior communicating artery, aneurysm, clipping, aneurysm rupture, recurrence.

*E-mail: shkil_08@ukr.net

Received: 25.04.2023 // Revised: 10.05.2023 // Accepted: 15.05.2023

CSF bypass operations before aneurysm clipping. Postoperative mortality in this group of patients was 11 %, and severe neurological deficits were 22 %.

It was established that repeated ruptures of AComA aneurysms occurred in 15 % of treated patients after admission to the hospital.

Conclusions. Microsurgical treatment provides a minimally invasive approach that minimizes damage to the surrounding brain tissue and helps preserve brain function and minimizes the risk of postoperative neurological complications.

Key words: anterior communicating artery, aneurysm, clipping, aneurysm rupture, recurrence.

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(2), 175-180

Мікрохірургічне лікування аневризм передньої сполучної артерії (ПСА) – процедура, що потребує унікальних навичок і знань. Анатомічно сегмент передньої сполучної артерії варіабельний, розташований глибоко між обома лобними частками. Тому мікрохірургія цих аневризм є вкрай делікатною, і, незважаючи на прогрес у розвитку мікрохірургічних технік, аневризми ПСА залишаються складним захворюванням для лікування [1–5].

Мета роботи

Оцінити ефективність мікрохірургічного кліпування аневризми ПСА як методу профілактики повторного розриву аневризми.

Матеріали і методи дослідження

Вибір пацієнтів для дослідження здійснили за історіями хвороб хворих, які були прооперовані в Обласному клінічному центрі нейрохірургії та неврології (м. Ужгород) і КНП «Міська лікарня екстреної та швидкої медичної допомоги» ЗМР (м. Запоріжжя). Критерій залучення – наявність аневризми ПСА. У дослідження включили 98 пацієнтів, середній вік – $47,8 \pm 11,0$ року, співвідношення жінок і чоловіків – 1,04 : 1,00.

Дослідження, здійснене за участю людей, схвалене місцевим комітетом з біоетики. Під час роботи дотримувалися принципів Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації («Етичні принципи медичних досліджень за участю людини як об'єкта дослідження»). Письмову інформовану згоду надали всі учасники досліджень (за пацієнтів, які були недієздатні, згоду надавали родичі).

Аневризми верифікували за допомогою комп'ютерної томографії судин голови та шиї, селективної церебральної ангіографії, МРТ ангіографії судин головного мозку. Під час дослідження використали таке обладнання: комп'ютерний томограф Toshiba «Astelion» (2016 р., № 4CC162106), ангіографічна установка «General Energy Optima IGS 330» (2019, № 80071260314), магнітно-резонансний томограф «i_Open 0,36 T» (2005 р., № Tос102633006), ультразвукова діагностична система «Philips HD7» (2014 р., № 69935).

Для статистичного опрацювання даних використовували пакет статистичної програми R, версія 4.0.0, поширюється за вільною ліцензією GNU General Public License 3, а також програму Microsoft Office Excel 2007.

Результати

Мікрохірургічне кліпування аневризм ПСА виконали 98 пацієнтам. Аневризми ПСА найчастіше виявляли на з'єднанні А1-А2 з домінантного боку. Кут нахилу артерій у місці біфуркації та напрям кровотоку – фактори гемодинамічного стресу в апікальній ділянці, де часто виникають ці аневризми. Їх виявляють на біфуркації домінантних А1, А2 і ПСА, зазвичай – у напрямі від домінантного А1. Аневризми ПСА більш схильні до розриву, становлять найвищі показники захворюваності серед аневризм переднього кола кровообігу.

Резекція прямої звивини в поєднанні з птеріальним доступом популяризована Ясаргілом, стала стандартом для лікування аневризм ПСА. Втім, доволі широко використовують й інші доступи до основи черепа.

Вибір кліпси надзвичайно важливий, враховували можливість збереження кровотоку по перфорантах. Адекватне розсічення та оголення всього комплексу ПМА-ПСА перед кліпуванням – ключ до позитивного результату втручання. Відокремлення перфорантів від шийки або купола артерії та збереження материнської судини – складна проблема для хірурга, що ускладнює досягнення хорошого результату.

Операції, що виконали усім пацієнтам у перші 14 днів після розриву аневризми, – втручання, здійснені в гострому періоді крововиливу. Їхня мета – профілактика повторного розриву аневризми, що міг спричинити повторні внутрішньочерепні крововиливи, небезпечні для життя. Мікрохірургічне закриття аневризми у гострому періоді забезпечувало також ефективніше лікування ускладнень субарахноїдального крововиливу, як-от ангіоспазму церебральних артерій.

Важливу роль під час визначення тактики лікування, планування мікрохірургічного втручання, встановлення термінів втручання мало оцінювання ангіоспазму за даними ангіографії. Наявність і вираженість ангіоспазму визначали на ділянках А1, А2 ПМА, СМА і ВСА з обох боків. Ангіоспазм вважали вираженим, якщо його виявляли у трьох і більше сегментах.

Якщо діагностували гостру внутрішньомозкову інсульт-гематому, що призводила до набряку головного мозку та дислокації серединних структур, виконували операції з видалення гематоми за ургентними показаннями. Кліпування аневризми як джерела кровотечі здійснювали відразу після видалення гематоми.

У разі масивного субарахноїдального крововиливу, що спричинений розривом аневризми ПСА, часто виникає

таке ускладнення, як оклюзійна гідроцефалія. В деяких випадках це також зумовило необхідність ургентного оперативного втручання – дренажу бокових шлуночків.

Найчастіше під час мікрохірургічного лікування аневризм ПСА застосовували птеріональний доступ. Здійснили трьохточкову жорстку фіксацію голови скобою Мейфілда. Середній розмір трепанаційного вікна становив $3,0 \times 4,0$ см, $4,0 \times 4,0$ см.

Особливості мікрохірургії аневризм ПСА (супровідний відеофайл доступний онлайн <https://youtu.be/6Ni8a6sM2FE>). Під час вибору боку доступу до аневризми ПСА віддавали перевагу боку домінантного А1 сегмента. Це дало змогу досягти раннього проксимального контролю і зменшити ризики можливого інтраопераційного розриву під час доступу до аневризми або її дисекції.

Інколи при аневризмах комплексу ПМА-ПСА для запобігання надмірній тракції лобної долі та венозним інфарктам головного мозку потрібно було розкрити проксимальну частину Сільвієвої щілини.

Детальний аналіз 3D-моделі КТ ангиографії судин головного мозку в передопераційному плануванні дав змогу візуалізувати А1 сегмент ПМА в положенні, коли вона спрямована медіально над хіазмою. Це давало можливість не виділяти біфуркацію внутрішньої сонної артерії для виявлення ходу А1 сегмента ПМА.

У перші три доби від розриву аневризми мікрохірургічне лікування здійснили 18 найтяжчим пацієнтам. У більш пізні терміни хірургічне втручання виконали пацієнтам із компенсованим і субкомпенсованим станом; надалі хворих дообстежили з ретельним плануванням мікрохірургічної тактики. Наявність компресії мозку, вираженої дислокації, оклюзійної гідроцефалії – показання до екстреної операції. Ангіоспазм виявлений у 45 пацієнтів (45,9 %): виражений – у 36 %, поширений – у 20 %. Внутрішньомозкові гематоми виявили у 30 (30,6 %), внутрішньошлуночкові крововиливи – у 28 (28,6 %) хворих. У п'яти випадках внутрішньомозкові гематоми призводили до вираженої компресії головного мозку та дислокації серединних структур, тому здійснили видалення гематом та кліпування аневризми.

У 50 % пацієнтів із внутрішньошлуночковими крововиливами діагностували також внутрішньомозкові гематоми лобних долей, кров найчастіше локалізувалась у кількох шлуночках. Перед кліпуванням аневризми 4 хворим із декомпенсованою гідроцефалією здійснили вентрикуло-дренувальні та лікворо-шунтувальні операції. Післяопераційна летальність у цій групі пацієнтів – 11,2 %, рівень вираженого неврологічного дефіциту – 22,5 %.

Встановили, що повторні розриви аневризм ПСА після надходження в стаціонар виникли у 15,0 % пацієнтів, які перебували на лікуванні (рис. 1).

Найчастіше повторний розрив відбувався протягом перших 8 діб після першого. Це свідчить про необхідність закриття аневризми мікрохірургічним шляхом протягом



Рис. 1. Співвідношення пацієнтів із повторним розривом ПСА та без нього.

цього часу для запобігання погіршенню стану пацієнтів і для зменшення рівня інвалідизації, смертності хворих із цією патологією.

Під час мікрохірургічного втручання з приводу закриття МА ПСА у 12 пацієнтів (12,2 %) спостерігали інтраопераційний розрив аневризми з вираженою кровотечею. У 2 хворих розрив аневризми під час хірургічного втручання призвів до набряку головного мозку, що ускладнювало маніпуляції в глибині операційного поля. Набряк головного мозку незначний, медикаментозно корегований внутрішньовенним введенням 15 % розчину манітолу. В цих випадках оперативне втручання завершилось встановленням кісткового фрагмента черепа на місце з наступною фіксацією. В одному випадку діагностували виражений ангіоспазм, що спричинив смерть пацієнта на 10 добу.

Проаналізували залежність результатів операцій від наявності інтраопераційної кровотечі з аневризми ПСА. Не виявили значущу статистичну залежність між результатами мікрохірургічного втручання та повторним розривом аневризми під час операції ($\chi^2 = 3,62$, $p = 0,306$). Втім, летальність у групі хворих, у яких під час операції спостерігали повторну кровотечу з розірваної аневризми, вища, ніж в інших пацієнтів ($\chi^2 = 1,27$, $p = 0,260$) (табл. 1).

У разі мікрохірургічного закриття аневризм ПСА в пацієнтів з інтраопераційною кровотечею, що спричинена повторним розривом, результати лікування гірші, а летальність вища через виникнення набряку головного мозку та посилення ішемії. При вираженій кровотечі в цій ситуації значно складнішим ставало виділення шийки аневризми та збереження важливих перфорантів. Це спричиняло збільшення тривалості тракції певних частин півкуль головного мозку, посилення та поширення ангіоспазму, поглиблення ішемії та зростання загальної тривалості операції. Щоб зупинити кровотечу під час мікрохірургічного оперативного втручання, для кращої орієнтації в рані, хірург змушений був поспішно і терміново застосовувати тимчасове кліпування сегментів А1 із двох боків, не враховуючи анатомічні особливості комплексу ПМА-ПСА. Це зумовлювало більш виражену іше-

Таблиця 1. Результати мікрохірургічного лікування в залежності від наявності інтраопераційного розриву аневризми

Результати лікування	Інтраопераційний розрив		Кількість хворих
	Немає	Є	
Хороший	57 (66,2 %)	8 (66,7 %)	65 (66,3 %)
Помірна інвалідизація	17 (19,8 %)	1 (8,3 %)	18 (18,4 %)
Істотна інвалідизація	4 (4,7 %)	0 (0 %)	4 (4,1 %)
Вегетативний стан	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Летальний випадок	8 (9,3 %)	3 (25,0 %)	11 (11,2 %)
Загалом	86 (100 %)	12 (100 %)	98 (100 %)

Таблиця 2. Результати мікрохірургічного лікування хворих залежно від тривалості тимчасового кліпування передньої мозкової артерії

Результати лікування	Тривалість тимчасового кліпування, хвилини				Кількість хворих
	<5	5–9	10–14	≥15	
Хороший	22 (88,0 %)	30 (78,9 %)	4 (50,0 %)	0 (0 %)	56 (74,7 %)
Помірна інвалідизація	0 (0 %)	3 (7,9 %)	1 (12,5 %)	2 (50,0 %)*	6 (8,0 %)
Істотна інвалідизація	0 (0 %)	2 (5,3 %)	1 (12,5 %)	1 (25,0 %)*	4 (5,3 %)
Вегетативний стан	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Летальний випадок	3 (12,0 %)	3 (7,9 %)	2 (25,0 %)	1 (25,0 %)*	9 (12,0 %)
Загалом	25 (100 %)	38 (100 %)	8 (100 %)	4 (100 %)	75 (100 %)

Аналіз таблиці зв'язаний за критерієм χ^2 та p ($\chi^2 = 12,72$, $p = 0,00036$).

мію головного мозку та збільшення частоти виникнення неврологічного дефіциту у післяопераційному періоді.

Щодо превентивного кліпування виявили: результати мікрохірургічного лікування не залежали від нього ($\chi^2 = 22,58$, $p = 0,0722$). Із 98 пацієнтів, яким здійснили кліпування мішкоподібної аневризми ПСА, у 75 (76,5 %) випадках під час оперативного втручання накладали тимчасову кліпсу: 56 (74,7 %) пацієнтам – превентивне кліпування сегментів А1 з одного чи обох боків. У 12 (12,2 %) хворих спостерігали інтраопераційний розрив аневризми, тому накладання тимчасової кліпси – вимушених захід для зупинення кровотоку. Середня тривалість накладання тимчасової кліпси – $6,96 \pm 4,90$ хвилини (від 1 до 25 хв).

Результати мікрохірургічного лікування не відрізнялись у хворих із різною тривалістю кліпування, якщо вона не перевищувала 15 хв. Накладання тимчасового кліпса на понад 15 хв істотно збільшувало частоту розвитку стійкого неврологічного дефіциту (табл. 2).

Обсяг оперативного втручання змінювався залежно від мікрохірургічної анатомії комплексу ПМА-ПСА. Не виявили залежність результатів операції від розміру аневризми, кількості камер, індексу аневризми.

Обговорення

Мікрохірургічне кліпування – добре відомий метод лікування аневризм ПСА [7,8]. Техніка передбачає доступ до аневризми через невеликий розріз на шкірі голови та черепі з наступним розміщенням металевих затискач

на шийці аневризми, щоб перекрити кровотік і запобігти наступному зростанню або розриву.

Рівень успіху мікрохірургічного кліпування аневризм ПСА загалом високий, – за повідомленнями, від 70 % до 100 % [9]. Втім, ефективність кліпування порівняно з іншими варіантами лікування все ще дискутується [9,10].

У нашому дослідженні виявили, що мікрохірургічне кліпування було дуже ефективним щодо запобігання повторному розриву аневризми в пацієнтів з аневризмою ПСА. Низький рівень залишкової аневризми та відсутність повторного розриву аневризми протягом періоду спостереження підтверджують, що мікрохірургічне кліпування – безпечний і надійний варіант лікування аневризм ПСА.

Нині для лікування аневризм передньої сполучної артерії розроблено кілька нових хірургічних підходів [6,11–13]:

1. ендovasкулярні підходи: ендovasкулярні методи включають доступ до аневризми через невеликий розріз у паху та використання катетерів для навігації до місця аневризми для розгортання спіралей або інших пристроїв для оклюзії аневризми. Цей малоінвазивний підхід стає все більш популярним, особливо для малих або середніх аневризм;

2. гібридні підходи передбачають поєднання мікрохірургічних та ендovasкулярних методів лікування складних аневризм ПСА; цей підхід дає змогу використовувати найкращі елементи, що сприяє оптимізації результатів;

3. тривимірний (3D) друк: прогрес у технології 3D-друку дав змогу створювати індивідуальні моделі аневризми та навколишньої анатомії для кожного пацієнта; ці моделі можна застосовувати для планування хірургічних підходів і відпрацювання техніки перед операцією;

4. інтраопераційна візуалізація: нові методи візуалізації, як-от інтраопераційна ангіографія та ультразвук, можна використовувати під час операції, щоб допомогти хірургу в режимі реального часу оцінити ефективність кліпування, забезпечуючи повну оклюзію аневризми та мінімізуючи ускладнення;

5. мінімально інвазивні методи: деякі новітні мікрохірургічні методи є менш інвазивними, ніж традиційна відкрита хірургія, включаючи використання невеликих краніотомій, мікрохірургічних затискачів і мікрохірургічних розрізів.

Загалом розроблення нових хірургічних підходів дає змогу здійснювати більш адаптоване й ефективне лікування аневризм ПСА, що сприяє покращенню результатів пацієнтів.

В останні роки опубліковано кілька досліджень щодо мікрохірургічного кліпування аневризм ПСА [14,15]. Ці дослідження надали додаткові докази щодо ефективності та безпеки цього методу лікування. Автори зробили висновок, що мікрохірургічне кліпування є ефективним варіантом лікування аневризм ПСА зі значно нижчою частотою рецидивів [6,16]. У цих та інших дослідженнях [17] показано ефективність і безпеку мікрохірургічного кліпування як методу лікування аневризм ПСА.

Висновки

1. Мікрохірургічне лікування забезпечує малоінвазивний підхід, що мінімізує пошкодження навколишньої тканини мозку. Це допомагає зберегти функцію мозку та мінімізувати ризик післяопераційних неврологічних ускладнень.

2. Завдяки точності мікрохірургічної техніки можна досягти більшої точності доступу та видалення аневризми.

3. Мікрохірургічне лікування дає змогу застосувати індивідуальний підхід до лікування кожної окремої аневризми, обрати оптимальний хірургічний доступ, ґрунтуючись на розмірі, розташуванні та формі аневризми. Це сприяє покращенню результатів, зменшенню ускладнень.

4. Пацієнти, яким здійснили мікрохірургічне лікування аневризм ПСА, часто мають кращі результати, ніж ті, в кого застосовували інші методи лікування.

Перспективи подальших досліджень полягають у розробленні нових і вдосконаленні наявних мікрохірургічних методів для поліпшення результатів у пацієнтів, а також використанні нових технологій (удосконалена візуалізація та 3D-моделювання), що допоможуть хірургам краще планувати та виконувати мікрохірургічні процедури для аневризм ПСА. Крім того, перспективним є вивчення віддалених результатів мікрохірургічного лікування аневризм ПСА та визначення факторів, що сприяють успішним результатам.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Відомості про автора:

Шкіль І. О., лікар-нейрохірург вищої категорії, КНП «Запорізька обласна клінічна лікарня» ЗОР, м. Запоріжжя, Україна.
ORCID ID: 0009-0004-9979-1152

Information about the author:

Shkil I. O., MD, Neurosurgeon of Higher Attestation Category, Municipal Non-Commercial enterprise "Zaporizhzhia Regional Clinical Hospital" of Zaporizhzhia City Council, Ukraine.

References

- [1] Peng, C., Diao, Y. H., Cai, S. F., & Yang, X. Y. (2022). Endovascular coiling versus microsurgical clipping for ruptured intracranial aneurysms: a meta-analysis and systematic review. *Chinese neurosurgical journal*, 8(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s41016-022-00283-3>
- [2] Forbes, J. A., D'herbemont, S., Lehner, K. R., Pineda Martinez, D., Navarro-Chávez, I. P., Mendez Rosito, D., & Schwartz, T. H. (2018). Feasibility of endoscopic endonasal approach for clip application of cerebral aneurysms: a systematic review. *Journal of neurosurgical sciences*, 62(6), 650-657. <https://doi.org/10.23736/S0390-5616.18.04405-3>
- [3] Harris, L., Hill, C. S., Elliot, M., Fitzpatrick, T., Ghosh, A., & Vindlacheruvu, R. (2021). Comparison between outcomes of endovascular and surgical treatments of ruptured anterior communicating artery aneurysms. *British journal of neurosurgery*, 35(3), 313-318. <https://doi.org/10.1080/02688697.2020.1812517>
- [4] Belavadi, R., Gudigopuram, S. V. R., Raguthu, C. C., Gajjala, H., Kela, I., Kakarala, C. L., Hassan, M., & Sange, I. (2021). Surgical Clipping Versus Endovascular Coiling in the Management of Intracranial Aneurysms. *Cureus*, 13(12), e20478. <https://doi.org/10.7759/cureus.20478>
- [5] Lindgren, A., Vergouwen, M. D., van der Schaaf, I., Algra, A., Wermer, M., Clarke, M. J., & Rinkel, G. J. (2018). Endovascular coiling versus neurosurgical clipping for people with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *The Cochrane database of systematic reviews*, 8(8), CD003085. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003085.pub3>
- [6] Lee, S. H., & Park, J. S. (2022). Outcome of ruptured anterior communicating artery aneurysm treatment compared between surgical clipping and endovascular coiling: A single-center analysis. *Medicine*, 101(38), e30754. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000030754>
- [7] Sattari, S. A., Shahbandi, A., Lee, R. P., Feghali, J., Rincon-Torrella, J., Yang, W., Abdulrahim, M., Ahmadi, S., So, R. J., Hung, A., Caplan, J. M., Gonzalez, F., Tamargo, R. J., Huang, J., & Xu, R. (2023). Surgery or Endovascular Treatment in Patients with Anterior Communicating Artery Aneurysm: A Systematic Review and Meta-Analysis. *World neurosurgery*, 175, 31-44. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2023.03.111>
- [8] Nowicki, J., Harding, M., & Aromataris, E. (2022). Clinical outcomes of microvascular clipping compared to endovascular coiling for ruptured anterior communicating artery aneurysms: a systematic review protocol. *JBI evidence synthesis*, 20(8), 2032-2039. <https://doi.org/10.11124/JBIES-21-00332>
- [9] Brzegowy, P., Kucybała, I., Krupa, K., Łasocha, B., Wilk, A., Latacz, P., Urbanik, A., & Popiela, T. J. (2019). Angiographic and clinical results of anterior communicating artery aneurysm endovascular treatment. *Wideochirurgia i inne techniki małoinwazyjne = Videosurgery and other miniinvasive techniques*, 14(3), 451-460. <https://doi.org/10.5114/wiitm.2019.81406>
- [10] Lawton, M. T., & Vates, G. E. (2017). Subarachnoid Hemorrhage. *The New England journal of medicine*, 377(3), 257-266. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1605827>
- [11] Chung, D. Y., Abdalkader, M., & Nguyen, T. N. (2021). Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Neurologic clinics*, 39(2), 419-442. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2021.02.006>
- [12] Zhu, W., Ling, X., Petersen, J. D., Liu, J., Xiao, A., & Huang, J. (2022). Clipping versus coiling for aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Neurosurgical review*, 45(2), 1291-1302. <https://doi.org/10.1007/s10143-021-01704-0>
- [13] Williams, L. N., & Brown, R. D., Jr (2013). Management of unruptured intracranial aneurysms. *Neurology. Clinical practice*, 3(2), 99-108. <https://doi.org/10.1212/CPJ.0b013e31828d9f6b>

- [14] Beuing, O., Lenz, A., Donitza, A., Becker, M., Serowy, S., & Skalej, M. (2020). Stent-assisted coiling of broad-necked intracranial aneurysms with a new braided microstent (Accero): procedural results and long-term follow-up. *Scientific reports*, 10(1), 412. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57102-6>
- [15] Nussbaum, E. S., Touchette, J. C., Madison, M. T., Goddard, J. K., Lassig, J. P., & Nussbaum, L. A. (2020). Microsurgical Treatment of Unruptured Anterior Communicating Artery Aneurysms: Approaches and Outcomes in a Large Contemporary Series and Review of the Literature. *Operative neurosurgery*, 19(6), 678-690. <https://doi.org/10.1093/ons/opaa214>
- [16] Kim, M., Kim, B. J., Son, W., & Park, J. (2021). Postoperative Clipping Status after a Pterional versus Interhemispheric Approach for High-Positioned Anterior Communicating Artery Aneurysms. *Journal of Korean Neurosurgical Society*, 64(4), 524-533. <https://doi.org/10.3340/jkns.2020.0215>
- [17] Fukuda, H., Hamada, F., Nonaka, M., Ueba, Y., Fukui, N., Kurosaki, Y., Morioka, J., Koyanagi, M., Nakajima, N., Uezato, M., Yasuda, T., Chin, M., Yamagata, S., Murao, K., Yamada, K., Ohta, T., Lo, B., & Ueba, T. (2021). Impact of subcallosal artery origin and A1 asymmetry on surgical outcomes of anterior communicating artery aneurysms. *Acta neurochirurgica*, 163(11), 2955-2965. <https://doi.org/10.1007/s00701-021-04979-w>



Понятійно-термінологічний апарат з дисциплінарної відповідальності в фармацевтичній діяльності

О. Г. Алексєєв *

Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна

Аналіз змісту норми та її тлумачення Конституційним Судом України дає підстави зробити висновок про невідповідність трудового законодавства вимогам Конституції України, необхідне узгодження профільних норм з Основним законом.

Мета роботи – аналіз сучасної проблеми термінологічних аспектів дисциплінарної відповідальності у фармацевтичній діяльності за чинним законодавством.

Матеріали та методи. Здійснили дослідження за допомогою порівняльно-правового, історичного методів, а також методів аналізу та синтезу.

Результати. Вивчали проблеми законодавства, що пов'язані з відсутністю особливого підходу до врегулювання відносин дисциплінарної відповідальності в фармацевтичній діяльності. Встановили, що нині для фармацевтичних працівників встановлений режим загальної дисциплінарної відповідальності. Навели приклади регулювання дисциплінарної відповідальності в фармацевтичній діяльності розвинених країн, що підтвердили: сучасний національний законодавчий підхід не відповідає міжнародній практиці побудови системи охорони здоров'я населення.

Висновки. Обґрунтували необхідність встановлення режиму спеціальної дисциплінарної відповідальності для фармацевтичних працівників, що має передбачати створення спеціального органу, що буде наділений повноваженнями з розгляду дисциплінарних проваджень та ухвалення рішення про накладення дисциплінарних стягнень, особливий порядок розгляду дисциплінарних проваджень, розширений перелік видів дисциплінарних стягнень.

Ключові слова: відповідальність фармацевтів, фармацевтичне право, дисциплінарний проступок, фармацевтичний працівник, трудова дисципліна.

Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2023. Т. 16, № 2(42). С. 181-185

Conceptual and terminological apparatus for disciplinary responsibility in pharmaceutical activity

O. H. Aleksieiev

The analysis of the content of the norm and its interpretation by the Constitutional Court of Ukraine leads to the conclusion that the labor legislation does not comply with the requirements of the Constitution of Ukraine, and the emphasis is placed on the need to harmonize the relevant norms with the Basic Law.

The aim of the work is to analyze the modern problem of terminological aspects of disciplinary responsibility in pharmaceutical activity according to the current legislation.

Materials and methods. The research was conducted using comparative legal, historical methods, methods of analysis and synthesis.

Results. Attention is paid to the problems of legislation related to the lack of a special approach to the regulation of disciplinary responsibility in pharmaceutical activity. It is noted that at the moment, a regime of general disciplinary responsibility has been established for pharmaceutical workers. Citing examples of the regulation of disciplinary responsibility in the pharmaceutical activity of developed countries, it is indicated that the modern national legislative approach does not correspond to the international practice of building a public health care system.

Conclusions. The establishment of a regime of special disciplinary responsibility for pharmaceutical workers is substantiated, which should include the creation of a special body that will be empowered to consider disciplinary proceedings and make a decision on the imposition of disciplinary sanctions, a special procedure for considering disciplinary proceedings, an expanded list of types of disciplinary sanctions.

Key words: responsibility of pharmacists, pharmacy legislation, disciplinary offense, pharmacists, employee discipline.

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(2), 181-185

ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/277085>

UDC 349.22:331.108.6j:615.15-057.4

DOI: [10.14739/2409-2932.2023.2.277085](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2023.2.277085)

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(2), 181-185

Key words: responsibility of pharmacists, pharmacy legislation, disciplinary offense, pharmacists, employee discipline.

*E-mail: agagroup@ukr.net

Received: 11.04.2023 // Revised: 20.04.2023 // Accepted: 28.04.2023

Питання щодо теоретико-правових і нормативно-правових аспектів дисциплінарної відповідальності фармацевтичних працівників, а також щодо поняття фармацевтичної діяльності порушені в попередніх роботах [1].

Комплексний аналіз чинних законодавчих актів України, що регулюють суспільні відносини з охорони здоров'я, дав змогу зробити висновок: фармацевтична діяльність – одна з галузей у сфері охорони здоров'я, яка здійснюється шляхом провадження ліцензованої господарської діяльності суб'єктами господарювання та професійної діяльності негосподарюючими суб'єктами – фармацевтичними працівниками. На основі консолідації та аналізу різних підходів науковці виокремили основні ознаки дисциплінарної відповідальності, навели авторське визначення дисциплінарної відповідальності фармацевтичних працівників [1]. Так, по-перше, дисциплінарна відповідальність є різновидом юридичної відповідальності; по-друге, для її застосування необхідна наявність трудових правовідносин «працівник – роботодавець»; по-третє, дисциплінарна відповідальність передбачає правовий обов'язок працівника зазнати певних обмежень; по-четверте, дисциплінарна відповідальність є групою чітко визначених у законодавстві дисциплінарних стягнень.

Щодо дисциплінарної відповідальності фармацевтичних працівників, то, на думку автора, її слід розуміти як окремий вид юридичної відповідальності, що полягає у застосуванні до фармацевтичних працівників, які скоїли дисциплінарний проступок, дисциплінарних стягнень. Дисциплінарний проступок у фармацевтичній сфері визначили як протиправне винне невиконання або неналежає виконання фармацевтичним працівником трудових обов'язків, покладених на нього законодавством про працю, нормами галузевого законодавства, колективним і трудовим договорами трудових обов'язків.

Проаналізувавши законодавчу та загальнотеоретичну базу дисциплінарної відповідальності фармацевтичних працівників, визначили окремі проблеми нормативно-правового регулювання відповідної сфери, що мають негативний вплив на загальне функціонування сфери фармацевтичної діяльності. Намагання внести необхідні зміни у чинне законодавство не мало успіху, тому надалі необхідна актуалізація цих питань.

Мета роботи

Аналіз сучасної проблеми термінологічних аспектів дисциплінарної відповідальності у фармацевтичній діяльності за чинним законодавством.

Матеріали і методи дослідження

Матеріал для дослідження – сучасна нормативно-правова база, що встановлює дисциплінарну відповідальність у фармацевтичному секторі галузі охорони здоров'я.

Протягом роботи використовували методи інформаційного пошуку, аналізу, систематизації та узагальнення.

Результати

Питання дисциплінарної відповідальності працівників сфери охорони здоров'я вивчали такі українські вчені, як В. А. Андропова [2], С. В. Васильєв [3], А. В. Коваленко [4], А. А. Котвіцька [5] тощо. Порушену проблему вивчали і зарубіжні автори: Cathal T. Gallagher, Fatma Mukhtar, Toorpakiy Sarfaraz [6], Betty Chaar, Ling Yan, Xiaopei Zhao [7], Jack Simmons [8].

Фармацевтичні фахівці (асистенти фармацевтів або фармацевти) у відносинах з аптечною організацією (установою) є працівниками. Отже, на них поширюються норми трудового законодавства, що регламентують питання трудової дисципліни.

Згідно з конституційними положеннями, діяння, що є дисциплінарними правопорушеннями, та відповідальність за них визначаються тільки законами України [9]. У Рішенні Конституційного Суду України у справі за конституційним зверненням відкритого акціонерного товариства «Всеукраїнський Акціонерний Банк» щодо офіційного тлумачення положень пункту 22 частини першої статті 92 Конституції України, частин першої, третьої статті 2, частини першої статті 38 Кодексу України про адміністративні правопорушення (справа про відповідальність юридичних осіб) наведено: положення пункту 22 частини першої статті 92 Конституції України треба розуміти так, що ним безпосередньо не встановлюються види юридичної відповідальності. За цим положенням, тільки законами України визначаються засади цивільно-правової відповідальності, а також діяння, що є злочинами, адміністративними або дисциплінарними правопорушеннями як підстави кримінальної, адміністративної, дисциплінарної відповідальності, а також відповідальність за такі діяння. Тому ці питання не можуть бути предметом регулювання підзаконними нормативно-правовими актами [10].

Отже, Конституцією України чітко визначено: діяння працівника, що є об'єктивною стороною дисциплінарного правопорушення, та відповідальність за нього може визначатись лише законом. Спроба врегулювання таких відносин за допомогою підзаконних актів є такою, що суперечить п. 22 ч. 1 ст. 92 Конституції України.

Для реалізації відповідних конституційних положень у Кодексі законів про працю (далі – КЗпП) є Глава Х, яка встановлює норми, що належать до інституту трудової дисципліни в галузі трудового права. Згідно з положеннями ст. 147 цієї глави, за порушення трудової дисципліни до працівника може бути вжитий тільки один із заходів стягнення – догана чи звільнення [11].

Крім того, законодавством, статутами і положеннями про дисципліну можуть бути передбачені для окремих категорій працівників й інші дисциплінарні стягнення, наприклад, відповідно до ст. 66 ЗУ «Про державну службу» або ст. 109 ЗУ «Про судоустрій і статус суддів» [12,13]. Це пов'язано з розрізненням загальної та спеціальної дисциплінарної відповідальності. На думку К. В. Коваленка, загальна дисциплінарна відповідальність – це зазнання особою, винною у порушенні

норм трудової дисципліни, негативних наслідків з боку уповноваженого суб'єкта, що виражається у дисциплінарних стягненнях, види та підстави застосування яких передбачено КЗпП. Визначення спеціальної дисциплінарної відповідальності передбачає, що особа, винна в порушенні норм трудової дисципліни, зазнає негативних наслідків з боку уповноваженого суб'єкта, як-от дисциплінарних стягнень, види та підстави застосування яких передбачено спеціальними нормативно-правовими актами (закони, статuti, положення). Спеціальна дисциплінарна відповідальність характеризується спеціальним суб'єктом дисциплінарного проступку, особливим характером дисциплінарного проступку, спеціальними видами дисциплінарних стягнень, особливим порядком накладення та оскарження дисциплінарного стягнення. Спеціальна дисциплінарна відповідальність працівників відрізняється від загальної дисциплінарної відповідальності ширшим змістом дисциплінарного проступку і суворішими санкціями [14].

Проаналізувавши норму ч. 2 ст. 147 КЗпП, зробили висновки, що цей нормативно-правовий акт передбачає можливість встановлення, крім догани та звільнення, інших дисциплінарних стягнень, які можуть бути впроваджені в трьох формах: Закон; Статут про дисципліну; Положення про дисципліну [6]. Законодавець у формулюванні цієї норми чітко розділив ці три форми. На практиці Статут і Положення про дисципліну затверджуються або у формі закону (Дисциплінарний статут Збройних Сил України, Дисциплінарний статут Національної поліції України, Дисциплінарний статут органів внутрішніх справ України, Дисциплінарний статут служби цивільного захисту), або у формі Постанови Кабінету Міністрів України (Положення про дисципліну працівників гірничих підприємств, Положення про дисципліну працівників залізничного транспорту, Статуту про дисципліну працівників спеціальних (воєнізованих) аварійно-рятувальних служб). Чинним законодавством не передбачено ні порядку видання актів такого виду, ні конкретного уповноваженого суб'єкта для ухвалення відповідних актів.

Наведені приклади підтверджують, що вони можуть затверджуватись і законом, і підзаконним нормативно-правовим актом. Втім, Конституція України закріплює виключність законодавчого встановлення діянь, що є дисциплінарними правопорушеннями, та відповідальності за них. Тому така невідповідність положень КЗпП Конституції України може призвести до порушення прав фармацевтичних працівників у разі ухвалення відповідного Статуту або Положення у формі підзаконного нормативно-правового акта.

Вирішення цієї проблеми запропоновано у проєкті Трудового кодексу України за номером 2410 від 08.11.2019 року, де у ч. 2, 3 ст. 350 наведено: «Для окремих категорій працівників законами можуть встановлюватися інші види дисциплінарних стягнень. Не допускається застосування дисциплінарних стягнень, не передбачених цим Кодексом та законами» [15]. Можна погодитись з думкою Н. М. Хуторян, яка вважає: тільки

такий підхід дасть змогу забезпечити законність, обґрунтованість і об'єктивність при застосуванні заходів дисциплінарного стягнення [16]. Вважаємо, що така пропозиція у проєкті Трудового кодексу, по-перше, фактично вказує на недоліки чинної норми, по-друге, виходячи з цієї тези, є доречною, допоможе вирішити проблеми законодавчого врегулювання відповідних відносин.

Інша проблема національного законодавства щодо дисциплінарної відповідальності в фармацевтичній діяльності полягає в відсутності особливого підходу до врегулювання цих відносин. Процедурні питання щодо порядку розгляду дисциплінарного провадження, суб'єкта накладення дисциплінарного стягнення, оскарження відповідного рішення у сфері фармацевтичної діяльності належить тільки до регулювання КЗпП. Тобто нині для фармацевтичних працівників встановлений режим загальної дисциплінарної відповідальності, що не відповідає міжнародній практиці побудови системи охорони здоров'я населення.

Багато країн надали саме регулятору у сфері фармацевтичної діяльності дисциплінарні повноваження щодо осіб, які отримали відповідний дозвіл. Такий орган, наділений дисциплінарними повноваженнями, як правило, орієнтований лише на фармацевтів і зазвичай може ухвалювати рішення про винесення офіційного попередження, офіційної догани, накладення штрафу, тимчасової чи постійної заборони на здійснення аптечної практики, як у Нідерландах. Додаткові санкції можуть містити неможливість для фармацевта претендувати на відшкодування вартості медичної продукції та послуг, наданих пацієнтам, як у Франції.

Рішення дисциплінарного комітету може бути оскаржене шляхом подання заяви регулятору, як у Великій Британії та Франції, та/або у відповідний національний суд, як у Великій Британії. У більшості країн рішення дисциплінарного комітету не потребує затвердження іншими органами влади. Разом з цим, у Монако встановлено найсуворіші санкції (зупинення або припинення дії ліцензії фармацевта), що потребують публікації розпорядження міністерства охорони здоров'я, враховуючи рекомендації дисциплінарного комітету. Регламент роботи дисциплінарного комітету (від початку процесу до ухвалення остаточного рішення) зазвичай викладено в нормативних актах (законах або підзаконних актах виконавчої гілки влади), як у Великій Британії, Ізраїлі, Нідерландах та Франції.

Склад дисциплінарного комітету в різних країнах різний, залежить від типу регулятора в галузі фармацевтичної діяльності. Його може очолювати професійний суддя, як в Ізраїлі чи Франції, щоб забезпечувати дотримання належних процесів вчинення правосуддя. У Нідерландах голова та заступники голови регіональних дисциплінарних комітетів призначаються довічно (до досягнення 70-річного віку), і це ті самі люди для всіх медичних професій.

У країнах склалася різна ситуація щодо доступності рішень дисциплінарного комітету. Так, вони можуть бути

доступні для ознайомлення (і надаватися) громадськості та/або іншим закордонним регуляторам тільки поки вони чинні (наприклад, протягом періоду, на який припинено дію ліцензії), або вони можуть бути доступні на постійній основі [17].

В Україні вже пропонували ідеї щодо створення спеціалізованого органу, що був би наділений повноваженнями щодо розгляду скарг на дії фармацевтичних працівників і притягнення їх до дисциплінарної відповідальності. Так, у проєкті Закону про самоврядування медичних професій в Україні 2445-д від 03.07.2020 р. [18], який не прийнято, і в перспективному нині проєкті Закону «Про самоврядування в сфері охорони здоров'я в Україні» від 05.11.2021 р. [19], що винесено на громадське обговорення, пропонується створити Кваліфікаційно-дисциплінарну комісію Палати, яка наділена повноваженнями щодо розгляду скарг про порушення представником медичних професій Кодексу етики представників медичних професій Палати, рішень органів професійного самоврядування представників медичних професій, стандартів у сфері охорони здоров'я та ухвалення рішень щодо притягнення або не притягнення представника медичних професій до професійної дисциплінарної відповідальності. Вона створюється як постійно діючий колегіальний орган Палати, що є органом професійного самоврядування медичних професій.

У дослідженні С. Г. Убогова показано, що одним із позитивних аспектів цих законопроектів є запровадження професійної дисциплінарної відповідальності за вчинення дисциплінарних проступків. Це може бути одним із механізмів сприяння забезпеченню дотримання фахівцями професійних стандартів і норм професійної етики [20]. Створення такого органу буде вирішальним кроком для поглиблення спеціалізації інституту дисциплінарної відповідальності в фармацевтичній діяльності, зробіть процедуру розгляду дисциплінарного провадження щодо фармацевтичних працівників більш об'єктивною та неупередженою.

Ще один недолік загального режиму дисциплінарної відповідальності в фармацевтичній діяльності – відсутність особливого підходу до визначення видів дисциплінарних стягнень. Згідно з нормами КЗпП, у роботодавця є змога застосувати до працівника лише один із видів стягнень – догану або звільнення. На думку автора, ухвалення спеціальних норм щодо дисциплінарної відповідальності у фармацевтичній сфері не може відбуватися без визначення розширеного переліку дисциплінарних стягнень. Це дасть змогу більш диференційовано підходити до кожного фармацевтичного працівника, накладати адекватне стягнення залежно від вчиненого ним дисциплінарного проступку.

У наведених проєктах законів пропонували встановити такі види дисциплінарних стягнень:

- 1) попередження;
- 2) тимчасове зупинення дії свідоцтва про право на здійснення діяльності в сфері охорони здоров'я на строк до шести місяців;

3) припинення дії свідоцтва про право на здійснення діяльності в сфері охорони здоров'я.

У разі накладення дисциплінарного стягнення на представника медичних професій також може бути покладено обов'язок взяти участь у додаткових заходах з безперервного професійного розвитку [19,20].

Отже, такий підхід є нагальним, відбиває специфіку сфери діяльності працівників медичних професій. Доцільним вважаємо додати до цього переліку такий вид дисциплінарних стягнень, як зауваження (для незначних дисциплінарних проступків фармацевтичних працівників).

Висновки

1. Встановлено невідповідність положень КЗпП нормам Конституції України щодо форми застосування спеціальної дисциплінарної відповідальності. Проаналізувавши норму ч. 2 ст. 147 КЗпП, зробили висновок, що цей нормативно-правовий акт передбачає можливість встановлення, крім догани та звільнення, інших дисциплінарних стягнень, які можуть бути впроваджені у трьох формах: Закон, Статут про дисципліну, Положення про дисципліну. Втім, Конституція України закріплює виключність законодавчого встановлення діянь, що є дисциплінарними правопорушеннями, та відповідальності за них. Тому така невідповідність положень КЗпП Конституції України може призвести до порушення прав фармацевтичних працівників у разі ухвалення відповідного Статуту або Положення в формі підзаконного нормативно-правового акту. У цьому контексті наведено норму проєкту Трудового кодексу України за номером 2410 від 08.11.2019 р., що врегульовує цю прогалину. Це свідчить про наявність недоліків чинної норми, тому норма є доречною, допоможе вирішити проблеми законодавчого врегулювання цих відносин.

2. Доведено, що проблема національного законодавства щодо дисциплінарної відповідальності в фармацевтичній діяльності полягає в відсутності особливого підходу до врегулювання відповідних відносин. Нині для фармацевтичних фахівців встановлений режим загальної дисциплінарної відповідальності. Проаналізовано досвід розвинених країн, зробили висновок: чинний законодавчий підхід не відповідає міжнародній практиці побудови системи охорони здоров'я населення. Необхідне створення окремого органу, що розглядав би дисциплінарні провадження та ухвалював рішення про притягнення або не притягнення фармацевтичних фахівців до дисциплінарної відповідальності. Створення такого органу буде вирішальним кроком для поглиблення спеціалізації інституту дисциплінарної відповідальності в фармацевтичній діяльності, зробіть процедуру розгляду дисциплінарного провадження щодо фармацевтичних працівників більш об'єктивною та неупередженою.

3. Ухвалення спеціальних норм щодо дисциплінарної відповідальності в фармацевтичній сфері не може відбуватися без встановлення розширеного переліку дисциплінарних стягнень. Це дасть змогу більш дифе-

ренційовано підходити до кожного фармацевтичного працівника, накладати адекватне стягнення залежно від вчиненого ним дисциплінарного проступку. Запропоновано встановлення таких видів дисциплінарних стягнень, як зауваження, попередження, тимчасове зупинення дії свідоцтва про право на здійснення діяльності у сфері охорони здоров'я на строк до шести місяців, припинення дії свідоцтва про право на здійснення діяльності у сфері охорони здоров'я.

Перспективи подальших досліджень полягають у дослідженні питання щодо вдосконалення понятійного апарату дисциплінарної відповідальності фармацевтичних працівників.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: author has no conflict of interest to declare.

Відомості про автора:

Алексеев О. Г., канд. фарм. наук, доцент, зав. каф. соціальної медицини, громадського здоров'я, медичного та фармацевтичного права, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0003-4947-4998

Information about author:

Aleksieiev O. H., PhD, Associate Professor, Head of the Department of Social Medicine, Public Health, Medical and Pharmaceutical Law, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

References

- Aleksieiev, O. G. (2021). Dystsyplinarna vidpovidalnist farmatsevychnykh pratsivnykiv: zakonodavchyi ta teoretyko-pravovyi aspekty [Disciplinary liability of pharmaceutical workers: legislative and theoretical-legal aspects]. *Zdobutky klinichnoi i eksperymentalnoi medytsyny*, (2), 23-31. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.11603/1811-2471.2021.V.12.12199>
- Andronova, V. A. (2019). Dystsyplinarna vidpovidalnist medychnykh pratsivnykiv [Disciplinary penalty of medical workers]. *Aktualni problemy vitchyzniano yurysprudentsii*, (3), 64-67. [in Ukrainian].
- Vasyliiev, S. V. (2015). Osoblyvosti yurydychnoi vidpovidalnosti farmatsevychnykh pratsivnykiv v ukrainskykh huberniakh Rosiiskoi imperii u 2-ii polovini XIX, na pochatku XX st. [Features of the legal responsibility of pharmaceutical workers in the Ukrainian provinces of the Russian Empire in the second half of the nineteenth, early twentieth century]. *Pravo i suspilstvo*, (3), 18-22. [in Ukrainian].
- Kovalenko, A. V. (2014). Dystsyplinarna vidpovidalnist medychnoho pratsivnyka [Disciplinary responsibility for medical malpractice]. *Naukovyi visnyk Dnipropetrovskoho derzhavnoho universytetu vnutrishnikh sprav*, (2), 87-95. [in Ukrainian].
- Kotvitska, A. A., & Surikova, I. O. (2017). Profesiina vidpovidalnist farmatsevychnykh pratsivnykiv v Ukraini [Professional responsibility of pharmaceutical workers in Ukraine]. *Science and Life*. Processing of articles the International scientific conference (pp. 11-15). Czech Republic, Karlovy Vary: Skleneny Mustek. [in Ukrainian].
- Gallagher, C. T., Mukhtar, F., Sarfaraz, T., & Chaar, B. (2019). Fit to practise? Processes for dealing with misconduct among pharmacists in Australia, Canada, the UK and US. *Research in social & administrative pharmacy* RSAP, 15(10), 1195-1203. <https://doi.org/10.1016/j.sapharm.2018.10.025>
- Yan, L., & Zhao, X. (2017). Comparative Study on the Licensed Pharmacist System in China and the USA. *China Pharmacy*, (12), 2281-2283.
- Simmons, J. (n.d.). Tort Law: Pharmacist Malpractice Liability. *Berman & Simmons*. <https://www.bermansimmons.com/law-articles/tort-law-pharmacist-malpractice-liability>
- Verkhovna Rada of Ukraine. (1996, June 28). *The Constitution of Ukraine (no. 254k/96-VR)*. Revision on January 1, 2020. <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/254%D0%BA/96-%D0%B2%D1%80?lang=en#Text>
- Constitutional Court of Ukraine. (2001, May 30). *Rishennia Konstytutsiinoho Sudu Ukrainy u spravi za konstytutsiinym zvernenniam vidkrytoho aktsioneroho tovarystva "Vseukrainskyi Aktsionernyi Bank" shchodo ofitsiinoho tlumachennia polozhen punktu 22 chastyny pershoi statti 92 Konstytutsii Ukrainy, chastyn pershoi, tretioi statti 2, chastyny pershoi statti 38 Kodeksu Ukrainy pro administratyvnyi pravoporushennia (sprava no. 1-22/2001 pro vidpovidalnist yurydychnykh osib)* (no. 7-rp/2001). <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/en/v007p710-01?lang=uk#Text>
- Verkhovna Rada of Ukraine. (1971, December 10). *The Labor Code of Ukraine (no. 322-VIII)*. Revision on January 27, 2023. <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/322-08?lang=en#Text>
- Verkhovna Rada of Ukraine. (2015, December 10). Pro derzhavnu sluzhbu. *Law of Ukraine no. 889-VIII [About civil service (no. 889-VIII)]*. Revision on March 31, 2023. <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/889-19?lang=en#Text>
- Verkhovna Rada of Ukraine. (2016, June 2). *On the Judiciary and the Status of Judges (no. 1402-VIII)*. Revision on December 23, 2022. <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/1402-19?lang=en#Text>
- Kovalenko, K. V. (2008). Zahalna ta spetsialna dystsyplinarna vidpovidalnist [General and special disciplinary responsibility]. *Forum prava*, (2), 231-236. [in Ukrainian].
- Verkhovna Rada of Ukraine. (2019, November 10). *Proekt Trudovoho kodeksu Ukrainy [Draft Labor Code of Ukraine (no. 2410)]* https://w1.c1.rada.gov.ua/pls/zweb2/webproc4_1?pf3511=67331
- Khutorian, N. M. (2014). Problemy pravovoho rehuliuвання dystsyplinarnoi vidpovidalnosti pratsivnyka v proekti trudovoho kodeksu Ukrainy [Problems of legal regulation of employee disciplinary liability in the draft Labor Code of Ukraine]. *Mizhdystsyplinarni humanitarni studii. Seriya: Pravnychi nauky*, 1, 51-58. [in Ukrainian].
- WHO (2020). *The legal and regulatory framework for community pharmacies in the WHO European Region*. CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Verkhovna Rada of Ukraine. (2020, July 3). *Proekt Zakonu pro samovriaduvannya medychnykh profesii v Ukraini [Draft Law on Self-Government of Medical Professions in Ukraine (no. 2445-d)]*. http://w1.c1.rada.gov.ua/pls/zweb2/webproc4_1?pf3511=69359
- Proiekt Zakonu Ukrainy "Pro samovriaduvannya v sferi okhorony zdorovia v Ukraini" [Draft Law of Ukraine "On self-governance in the field of health care in Ukraine"]. *Apteka. online.ua*. <https://www.apteka.ua/article/616353>
- Ubohov S. H. (2020). Dumka farmatsevtva-vykladacha shchodo zakonoproiektu pro samovriaduvannya medychnykh profesii [Opinion of a pharmacist-teacher regarding the draft law on self-governance of medical professions]. *Apteka. online.ua*. <https://www.apteka.ua/article/569682>



Аналіз підходів до складання соціальної звітності фармацевтичних підприємств

Н. О. Ткаченко¹*, I. A. C. D. E. F., I. Я. Городецька², A. E., O. P. Левицька², A. E.

¹Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна, ²Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Україна

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті; F – остаточне затвердження статті

Мета роботи – пошук та обґрунтування уніфікованих підходів до соціальної звітності фармацевтичних підприємств, що уможливить оцінювання і порівняння соціально відповідальної поведінки фармацевтичних підприємств усіма зацікавленими сторонами.

Матеріали та методи. Матеріали – наукові та науково-методичні публікації, нормативні та законодавчі документи щодо соціальної відповідальності, інформація з офіційних сайтів вітчизняних виробничих фармацевтичних підприємств, які входили в топ-20 маркетингових організацій за обсягами аптечного продажу лікарських засобів у 2022 році щодо соціальної звітності. Застосували методи критичного аналізу, контент-аналізу, узагальнення й інтерпретації результатів.

Результати. Показано, що соціальна звітність фармацевтичних підприємств за кордоном є усталеною практикою, проте зміст таких звітів є досить різноманітним, тобто немає уніфікованого підходу до їх складання.

Шляхом вивчення інформаційного наповнення офіційних сайтів найбільших українських виробничих фармацевтичних підприємств було з'ясовано, що звіти про корпоративну соціальну відповідальність публікують лише АТ «Фармак», Корпорація «Артеріум» і ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ». Інформацію щодо заходів соціального спрямування інших фармацевтичних підприємств подано або у звітах про управління, або у новинах. Соціальна звітність вітчизняних фармацевтичних підприємств як явище, а також підходи до її складання, перебувають на етапі становлення, тому запропоновано зміст такої звітності для різних стейкхолдерів.

Висновки. Вітчизняні виробничі фармацевтичні підприємства застосовують різні критерії та різні підходи до інформування суспільства про свою соціальну активність, що ускладнює порівняння їхнього внеску у сталий розвиток країни.

Враховуючи, що одним з інструментів відкритості, покращення діяльності підприємства та підзвітності у контексті соціальної відповідальності є складання прозорої соціальної звітності, вітчизняним виробничим фармацевтичним підприємствам необхідно посилити роботу в цьому напрямі, спираючись на міжнародні стандарти.

Ключові слова: соціальна відповідальність, корпоративна соціальна відповідальність, фармацевтична галузь, фармацевтичне підприємство, соціальна звітність, соціальні практики.

Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2023. Т. 16, № 2(42). С. 186-193

Analysis of approaches to the preparation of social reporting of pharmaceutical enterprises

N. O. Tkachenko, I. Ya. Horodetska, O. R. Levytska

Aim. The work aims are to find and justify unified approaches to social reporting for pharmaceutical enterprises, which would enable the evaluation and comparison of the social activities of organizations across different market segments by all stakeholders.

Materials and methods. Materials are scientific and scientific-methodical publications, regulatory and legislative documents on social responsibility, and information from the official websites of domestic manufacturing pharmaceutical enterprises, which were included in the top 20 marketing organizations by the volume of drugs' pharmacy sales in 2022, to social reporting. Methods: critical analysis, content analysis, generalization, and interpretation of results.

Results. The study found that while social reporting of pharmaceutical enterprises is an established practice abroad, there is no unified approach to their preparation, resulting in a diverse range of content.

In Ukraine, it was observed that only JSC "Pharmak", Arterium Corporation, and PJSC RPC "Borshchagivskiy chemical and pharmaceutical plant" publish reports on their corporate social responsibility. Other pharmaceutical companies provide information on their social

ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/275452>

UDC 614.2:615.1:658

DOI: [10.14739/2409-2932.2023.2.275452](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2023.2.275452)

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(2), 186-193

Key words: social responsibility, corporate social responsibility, pharmaceutical industry, pharmaceutical enterprise, social reporting, social practices.

*E-mail: tkachenkonat2@gmail.com

Received: 15.03.2023 // Revised: 01.04.2023 // Accepted: 03.04.2023

measures either in management reports or in news. The phenomenon of social reporting of domestic pharmaceutical enterprises and the approaches to its preparation are still in the early stages of development. Therefore, this study proposes a framework for the content of such reports that caters to various stakeholders.

Conclusions. Domestic manufacturing pharmaceutical enterprises apply different criteria and different approaches to inform society about their social activities, making it difficult to compare their contribution to the sustainable development of the country.

It has been established that domestic pharmaceutical manufacturing enterprises need to strengthen their efforts in this direction. The preparation of transparent social reports based on international standards is one of the tools for promoting openness, improving the company's activities, and ensuring accountability in the context of social responsibility.

Key words: social responsibility, corporate social responsibility, pharmaceutical industry, pharmaceutical enterprise, social reporting, social practices.

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(2), 186-193

Сьогодні у світі послідовно втілюється в життя стратегія збільшення внеску бізнесу в соціальний прогрес і захист навколишнього середовища, тобто соціальної відповідальності (СВ) перед суспільством [1].

Згідно з міжнародним стандартом ISO 26000:2010 «Керівництво із соціальної відповідальності», СВ – це відповідальність організації за вплив її рішень і діяльності на суспільство та навколишнє середовище, що реалізується через прозору й етичну поведінку, сприяє сталому розвитку, включаючи здоров'я та добробут суспільства; враховує очікування зацікавлених сторін (ЗС), відповідає чинному законодавству і міжнародним нормам поведінки та інтегрована у всю організацію й практикується у її відносинах [2].

У 2019 р. було прийнято методом перекладу Національний стандарт України «Настанови щодо соціальної відповідальності» ДСТУ ISO 26000:2019 [3], що є ідентичним міжнародному стандарту ISO 26000:2010 «Guidance on social responsibility» [2]. Важливо підкреслити, що стандарт тільки дає рекомендації для користувачів, не призначений та не є придатним для цілей сертифікації, про що окремо наголошується в документі.

З огляду на те, що представники бізнес-середовища використовують термін «корпоративна соціальна відповідальність» (КСВ), а академічне середовище, громадські організації та споживачі – «соціальна відповідальність бізнесу» (СВБ), вважають, що ці поняття є синонімічними [4]. На думку В. З. Холявки та ін. [5], СВ охоплює проблему в цілому, тобто на рівні галузі, а КСВ розкриває соціальну діяльність на мікрорівні, тобто на рівні корпорації.

Незважаючи на те, що необхідність включення стратегій і програм КСВ, розроблених для фармацевтичної промисловості, є загально визнаною, на думку С. А. Меїя Reatiga et al. [6], галузь все ще демонструє поверхове ставлення до КСВ. Oger C. [7] встановлено, що розмір фармацевтичного підприємства (ФП), країна його походження, а також тип виробленої продукції (ліки, що відпускаються за рецептом, генерики, біофармацевтичні препарати) впливають на природу підходу до КСВ ФП. Крім того, констатовано, що соціально відповідальна поведінка (СВП) ФП позитивно впливає на їх прибутковість [8].

Важливою також є публічність інформації про практики КСВ ФП. При цьому великим компаніям (понад 500

працівників) рекомендовано публікувати «потрійний результат» у своїх річних звітах, який оцінює їхню ефективність за економічними, екологічними та соціальними критеріями [9]. Разом з тим дуже часто знання про те, наскільки звітність ФП надає вичерпну, суттєву, достовірну та точну інформацію про його фактичну діяльність, є обмеженими через відсутність необхідної літератури про практику соціальної звітності.

Отже, пошук єдиних підходів до інформування суспільства і всіх ЗС про діяльність ФП на засадах СВП є актуальним.

Мета роботи

Пошук та обґрунтування уніфікованих підходів до соціальної звітності (СЗ) ФП, що уможливить оцінювання і порівняння СВП ФП усіма ЗС.

Матеріали і методи дослідження

У роботі використано методи критичного аналізу, контент-аналізу, узагальнення й інтерпретації результатів.

Матеріал для дослідження – публікації фундаментальних і прикладних досліджень вітчизняних і зарубіжних науковців із порушеного питання, науково-методичні публікації, нормативні та законодавчі документи щодо СВ, інформація з офіційних сайтів вітчизняних виробничих ФП, які входили в топ-20 маркетингових організацій за обсягами аптечного продажу лікарських засобів у 2022 році щодо соціальної звітності [10–19].

Результати

Як зазначено у Зеленій книзі Європейської комісії, КСВ – це концепція, відповідно до якої компанії добровільно вирішують зробити свій внесок у покращення суспільства та чисте довкілля, тобто вони добровільно враховують соціальні й екологічні проблеми у своїх бізнес-операціях та у взаємодії з усіма ЗС [9]. Пасхавер О. Й. та співавт. [20] вважають, що СВБ – це добровільне дотримання компаніями принципів і стандартів соціально відповідального (корисного для суспільства і навколишнього середовища) ведення підприємництва на вищому, ніж встановлено законодавством, рівні.

У світовій фармацевтичній промисловості оперують низкою визначень поняття КСВ та є різні способи його

розуміння [8,21,22]. Наприклад, M. Del Castillo et al. визначають КСВ як набір практик, принципів і цінностей, які передбачають зобов'язання ФП поводитись етично і сприяти розвитку та якості життя всіх ЗС [21]. Min M. et al. для визначення КСВ у фармацевтичній промисловості використовують три основні елементи (екологічні, соціальні та економічні фактори) як основу для вивчення взаємозв'язку між КСВ та продуктивністю ФП [8]. У будь-якому разі у більшості визначень КСВ йдеться про ділову етику, релевантність ЗС, добровільний характер цих дій [22].

Аналіз, проведений M. Demir та M. Min [23], засвідчив, що хоча фармацевтична промисловість і перевершує інші галузі за повнотою звітності по КСВ, проте між ФП існують розбіжності у змісті їхньої інформації: наявність певного рівня стандартизації для розкриття інформації про вплив на навколишнє середовище і трудові відносини та відсутність такої стандартизації для інших напрямів (права людини, ланцюг поставок тощо).

Братішко Ю. С. [24] доведено, що процес оцінювання фактичного рівня СВ фармацевтичного підприємництва доцільно завершувати складанням СЗ. Встановлено, що в Україні це роблять лише 21 % досліджених ФП. Визначено, що хоча складання СЗ має добровільний характер, сьогодні доцільно застосовувати стандартизовану форму СЗ, яка надає можливість здійснювати порівняння зі звітами інших компаній, визначати соціально відповідальний рейтинг компанії та проводити соціальний аудит.

Переважає більшість публікацій у науковій літературі розкриває реалізацію КСВ на рівні ФП, оскільки останні відіграють дуже важливу роль у добробуті та здоров'ї населення через практики КСВ [6,23,25–29].

Так, N. A. Vitezić [26] за результатами аналізу практик КСВ підприємств фармацевтичної промисловості в регіоні, що охоплює Словенію, Хорватію, Сербію, Боснію і Герцеговину, зроблено висновок, що підхід до оцінювання КСВ ФП має бути уніфікований, оскільки між ЗС і фармацевтичною галуззю на час дослідження не було згоди щодо переліку показників, які б характеризували КСВ. Для цього авторка запропонувала модель СВП ФП. Крім того, вона констатує, що звітність за КСВ має бути синхронізована з європейськими кодексами та нормами.

Дослідження, проведене корейськими науковцями, засвідчило, що ФП в Кореї під час реалізації КСВ дотримуються рівня юридичних та економічних зобов'язань, намагаються досягти рівня етичних зобов'язань, але не займаються благодійністю [30]. При цьому у корейському суспільстві зростають зацікавленість щодо діяльності ФП з КСВ та очікування громадськості щодо соціального внеску фармацевтичної промисловості [31].

Аналіз, здійснений T. Dănescu і M. A. Pora [29] на прикладі Румунії, засвідчив, що ФП беруть участь у діях, які враховують суспільний добробут, пропонуючи фінансову підтримку та консультації для різних соціальних проєктів, орієнтуючись на підприємницьке та соціальне середовище, проводячи інформаційні кампанії щодо здоров'я населення та інвестуючи в проєкти охорони здоров'я.

Дослідження A. Haro-de-Rosario et al. [22] засвідчило, що ФП в Іспанії прихильно ставляться до втілення практик КСВ, особливо у разі найприбутковіших ФП, які мають найбільший досвід і готують свої звіти щодо сталого розвитку. При цьому найбільше розкривається інформація економічного (77,78 %), а найменше – екологічного (63 %) характеру.

Qian Y. [32] запропоновано концептуальну модель оцінювання КСВ ФП у Китаї. Вона включає вісім початкових вимірів (акціонери, менеджери та працівники; кредитори та постачальники, пацієнти та лікарі; уряд, навколишнє середовище та місцева громада), які трансформуються в три виміри другого порядку: КСВ для внутрішнього середовища ФП, КСВ для зовнішніх партнерів та КСВ для державних установ. Yang M. et al. [33] на підставі визначення точки перелому, коли фінансова віддача від КСВ перевищує витрати, доведено, що витрати на КСВ у фармацевтичній промисловості Китаю можуть бути компенсовані лише в віддаленій перспективі.

Tsutsui H. [34] досліджено фактори, які впливають на КСВ ФП у Японії, та представлено теоретичну модель, за якою великі ФП зі значною кількістю власників та міжнародних ЗС з високою ймовірністю братимуть участь у діяльності у сфері КСВ.

Filho C. F. S. et al. [35] досліджували особливості використання практик КСВ місцевих та зарубіжних ФП у Бразилії і встановили, що між ними є як схожість, так і розбіжності. Бразильські ФП більшу увагу приділяють ідентифікації своїх партнерів у проєктах КСВ порівняно з іноземними компаніями. Ще одна відмінність стосується декларації мети організації, де іноземні компанії чіткіше висловлюють свою відданість СВ та екологічній її складовій. Разом з тим автори констатують, що ці відмінності не є статистично значущими.

Сьогодні програми КСВ ФП Індії зосереджені насамперед на здоров'ї та здоровому способі життя, а багато ініціатив реалізуються у партнерстві з неурядовими організаціями, які добре знають роботу з місцевими громадами та є експертами у розв'язанні конкретних соціальних проблем [36,37,38]. Тим паче, що, згідно з чинним законодавством Індії, ФП з великим доходом варто витратити 2 % свого середньорічного чистого прибутку за три роки на КСВ у кожному фінансовому році [36,37].

Вагомий внесок у розвиток теорії та аналізу практики КСВ ФП та аптек зробили українські науковці. Зокрема, було досліджено світові моделі СВ за різних форм управління [39,40], рівень розуміння сутності цього поняття фармацевтичними фахівцями в Україні, їхню думку щодо наявних перешкод для розвитку СВ вітчизняними фармацевтичними організаціями, мотиви впровадження практик СВ у фармацевтичну діяльність [41,42]. Крім того, запропоновано визначення соціальної відповідальності фармацевтичних фахівців (СВ ФФ) та підкреслено, що СВ ФФ спрямована на первинні та вторинні соціальні групи, суспільство та індивідуума, а також на самого себе. А процес формування СВ ФФ

– складна багаторівнева система, що безперервно виховує, розвиває, удосконалює навички СВ протягом усього професійного життя [40,42,43]. Створено також модель правового поля формування системи СВ поведінки ФП протягом усього життєвого професійного циклу [44].

На думку О. В. Посилкіної та Ю. С. Братішко [45,46], СВ фармацевтичного бізнесу – це здатність суб'єктів фармацевтичної галузі брати на себе зобов'язання фінансового, економічного, соціального й екологічного характеру за наслідки їхньої діяльності перед усіма ЗС, яка реалізується через етичну поведінку з урахуванням інтересів і очікувань усіх стейкхолдерів при дотриманні чинного законодавства і міжнародних стандартів на принципах добровільності і взаємної вигоди. Подібна практика підвищує імідж українських ФП, сприяє укріпленню позитивної ділової репутації, що врешті призводить до зміцнення конкурентних позицій українських ФП як на вітчизняному, так і на міжнародному фармацевтичному ринку. Проте часто українські ФП у внутрішньофірмовому менеджменті наголошують на економічному аспекті бізнес-процесів і не приділяють достатньо уваги розвитку СВП [45].

Крім того, соціальне інвестування (СІ) ФП сьогодні у більшості випадків є проявом філантропії і має вигляд спонсорської допомоги окремими українськими ФП (переважно виробниками ліків). Водночас досить мізерними є інвестиції, що спрямовуються на охорону та відновлення довкілля, впровадження енерго- та ресурсощадних технологій, поліпшення умов праці в організаціях, розвиток людського капіталу, підвищення інноваційної активності. Незважаючи на це, дуже повільно, але все ж таки відбувається перехід від витратних форм соціальної політики та корпоративної благодійності до СІ, під яким слід розуміти не просто роздавання грошей та інших благ, а обґрунтовану та раціонально організовану стратегію КСВ [47].

Обговорення

З 2011 року в Україні за ініціативи Центру «Розвиток КСВ» (<http://csr-ukraine.org/>) здійснюють щорічне оцінювання вітчизняних компаній щодо прозорості в системі корпоративного управління та КСВ шляхом визначення індексу прозорості. У 2021 році він отримав назву Індекс ESG прозорості українських компаній (ESG Transparency Index 2020). ESG (Environmental, social and governance) – це соціальні, екологічні та управлінські фактори, які лежать в основі управління сталим розвитком компанії. Об'єкт оцінювання – інформація з веб-сайту компанії [48].

Як зазначає В. А. Євтушенко [49], інформація щодо корпоративного управління та КСВ оцінюється за чотирма основними категоріями, що мають відповідну вагу:

1. звітність (наявність нефінансового звіту, підготовленого за стандартом Глобальної ініціативи зі звітності, Глобального договору ООН або іншими стандартами; наявність звіту про екологічну та соціальну діяльність тощо) – 40 % від загального результату;

2. зміст (рівень розкриття інформації за основними сферами КСВ) – 35 % від загального результату;

3. навігація (зручність користування сайтом) – 10 % від загальної інформації;

4. доступність (мова, контактна інформація) – 15 % від загального результату.

Варто зазначити, що у 2020 році визначення Індексу ESG прозорості показало, що середній рівень розкриття інформації компаній України становив 32 % (максимальна кількість балів – 62,5). Єдине у цьому дослідженні виробниче ФП АТ «Фармак» посіло 13 місце у рейтингу і мало вищий за середній рівень розкриття інформації (50 балів) [48].

Спираючись на наведені результати досліджень, констатуємо факт, що нині не фінансова звітність, а СЗ стає одним із головних джерел інформування суспільства про рівень СВП і соціально орієнтоване ведення підприємництва. Перевага СЗ полягає у її доступності не лише керівництву ФП, а й усім ЗС, у тому числі державним органам. Держава, як ніхто інший, зацікавлена у тому, щоб ФП складала СЗ, оскільки є можливість відстежувати соціально-економічну ситуацію в країні та здійснювати ефективний менеджмент витрат на державні соціальні програми.

У світовій практиці СЗ має три форми надання: стандартизований звіт, довільна форма звітування та комплексний звіт.

Комплексні звіти відображають інформацію щодо діяльності ФП з трьох позицій: економічної, соціальної та екологічної. Так само, як і СЗ довільної форми, вони призначені для інформування стейкхолдерів, не підлягають аудиту, а отже не можуть бути використані для порівняння та рейтингування ФП. Відтак стандартизовані СЗ вважають оптимальною формою нефінансової звітності для будь-якої галузі, у тому числі й фармацевтичної.

Нині розроблено чимало стандартів СЗ [50], з них найпоширенішими є стандарти ISO 26000 [2], GRI (Global Reporting Initiative) [51], Account Ability 1000 (AA 1000) [52], Social Accountability 8000 (SA 8000) [53], ISO 14000 [54] та стандарти Саншайн [55]. Великий відсоток СЗ міжнародних компаній складають саме відповідно до цих стандартів.

Фундаментальний принцип стандартів полягає у наданні інформації ЗС для ухвалення раціональних, обґрунтованих рішень у системі вільного ринку та захисту себе від негативних наслідків корпоративних дій. Інформування має бути повним, точним, своєчасним, об'єктивним, зрозумілим і публічним. «Право знати» зацікавленої сторони має пріоритет над витратами, незручностями чи ризиком для корпорації.

Враховуючи галузеву специфіку фармації та її соціальну спрямованість, СЗ ФП має містити відомості за такими напрямками: інформація для споживачів (про фармацевтичний продукт чи послугу, відбір постачальників); інформація для співробітників, акціонерів, інвесторів (характеристика компанії, підходи до управління, умови праці та розвиток людського капіталу, показники резуль-

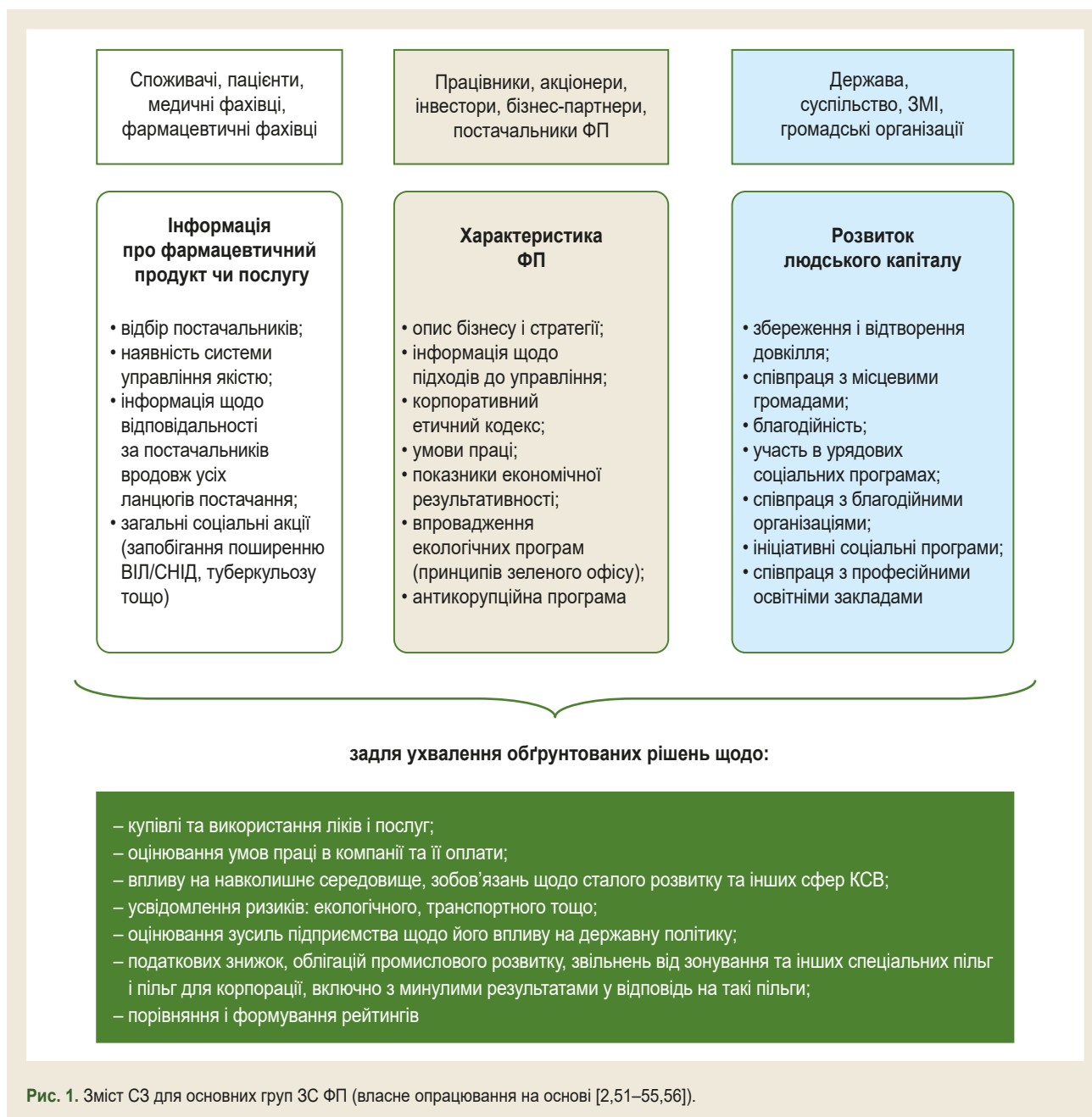


Рис. 1. Зміст СЗ для основних груп ЗС ФП (власне опрацювання на основі [2,51–55,56]).

тативності економічної та екологічної); інформація для суспільства (розвиток людського капіталу, збереження і відтворення навколишнього середовища, благодійність, співпраця з місцевими громадами тощо) (рис. 1).

Втім, аналіз СЗ українських виробничих ФП за інформаційним наповненням їхніх офіційних сайтів [11–19] (рис. 2) засвідчив, що переважна більшість ФП на своїх офіційних інтернет-сторінках мають рубрику, присвячену СВ, але на головній сторінці сайту її демонструють лише АТ «Фармак» та Корпорація «Артеріум». На сайтах інших ФП вона викладена в розділах «Про компанію» чи «Про нас».

Звіти про КСВ публікують лише АТ «Фармак», Корпорація «Артеріум» і ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ». Низка ФП подає інформацію про заходи соціального

спрямування або у звітах про управління (АТ «Київський вітамінний завод», ТОВ «ФК «Здоров'я» тощо), або у новинах (ТОВ «Кусум Фарм»), або додатково повторює цю інформацію і у звітах про управління, і у новинах (АТ «Фармак»).

Отже, останні п'ять років більшість досліджуваних ФП складають консолідований звіт чи звіти про управління, що унеможливило проведення галузевого порівняння і формування рейтингу СВБ. Відтак українським виробничим ФП доцільно активніше впроваджувати соціальні практики, які спрямовані на внутрішнє і зовнішнє середовище ФП, та використовувати міжнародні стандарти для інформування суспільства про них. Тим паче, що нині вітчизняні науковці напрацювали багато матеріалу щодо оцінювання рівня СВ ФП.

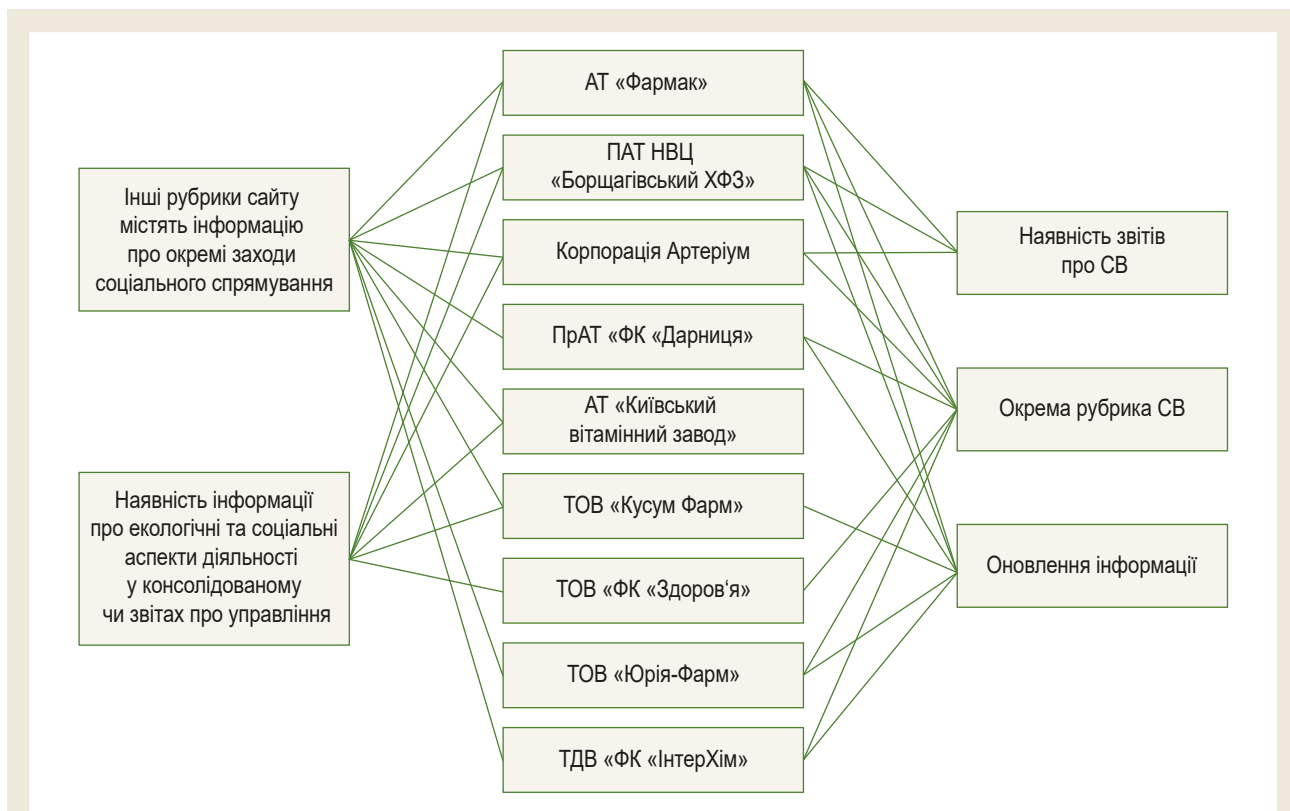


Рис. 2. Інформаційне наповнення офіційних інтернет-сайтів українських виробничих ФП щодо КСВ (власне опрацювання на основі [11–19]).

Висновки

1. Контент-аналіз публікацій фундаментальних і прикладних досліджень українських та зарубіжних науковців, а також порівняння практик КСВ найбільших вітчизняних виробничих ФП засвідчили, що ФП застосовують різні критерії та різні підходи до інформування суспільства про свою соціальну активність, що ускладнює порівняння їх внеску у сталий розвиток країни.

2. Враховуючи те, що одним з інструментів відкритості, покращення діяльності підприємства та підзвітності у контексті СВ є складання СЗ, українським ФП необхідно посилити роботу за цим напрямом.

Перспективи подальших досліджень полягають у продовженні вивчення соціальних практик і соціальної звітності аптечних закладів.

Подяка

Автори статті висловлюють вдячність Збройним силам України за можливість працювати, здійснювати і публікувати свої дослідження.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Відомості про авторів:

Ткаченко Н. О., д-р фарм. наук, професор, зав. каф. управління та економіки фармації, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-8566-5938

Городецька І. Я., канд. фарм. наук, доцент каф. організації та економіки фармації, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Україна.

ORCID ID: 0000-0003-0265-5505

Левицька О. Р., д-р фарм. наук, доцент каф. організації та економіки фармації, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-8113-2587

Information about authors:

Tkachenko N. O., PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Management and Pharmacy Economics, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

Horodetska I. Ya., PhD, Associate Professor of the Department of Organization and Economics of Pharmacy, Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Ukraine.

Levytska O. R., PhD, DSc, Associate Professor, Department of Organization and Economics of Pharmacy, Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Ukraine.

References

- [1] Breharia, S. (2016). Etapy stanovlennia korporatyvno-sotsialnoi vidpovidalnosti ukraïnskoho biznesu [Stages of formation of social corporate responsibility ukrainian business]. *Naukovi zapysky Instytutu politychnykh i etnonatsionalnykh doslidzhen im. I.F. Kurasa NAN Ukrainy*, (5-6), 312-326. [in Ukrainian]. https://iapiend.gov.ua/wp-content/uploads/2018/07/brecharia_etapy.pdf
- [2] International standard ISO 26000. Guidance on social responsibility (ISO 26000:2010(E)). https://iso26000.info/wp-content/uploads/2017/06/ISO-26000_2010_E_OBPpages.pdf
- [3] Budstandart Online. (2019). *Nastanovy shchodo sotsialnoi vidpovidalnosti: Natsionalnyi standart Ukrainy DSTU ISO 26000:2019 (ISO 26000:2010, IDT)* [Guidelines on social responsibility: National Standard of Ukraine ISO 26000:2019, IDT]. [in Ukrainian]. http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=91617

- [4] Bila, S. O. (2017, June 2). Yevropeyskiy dosvid uspishnoi praktyky sotsialnoi vidpovidalnosti biznesu: oriientyry dlia Ukrainy [European experience of successful practice of social responsibility of business: guidelines for Ukraine]. *Yevropeyski studii v Ukraini: zdobutky, vyklyky ta perspektivy*. Collection of materials of the International Scientific and Practical Conference (pp. 35-40). Kyiv: Ukrainiska Asotsiatsiia Vykkladachiv i Doslidnykiv Yevropeiskoi Intehratsii [in Ukrainian].
- [5] Kholiyavka, V., Huzar, U., & Leshko, Kh. (2021). Istorychni aspekty stanovlennia i rozvytku korporatyvnoi sotsialnoi vidpovidalnosti v Ukraini ta sviti [Historical aspects of formation and development of corporate social responsibility in Ukraine and the world]. *Ekonomika ta upravlinnia pidpriemstvamy*, 56, 90-96. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.32843/infrastruct56-15>
- [6] Mejia Reatiga, C. A., Gonzalez Barranco, S. E., & Torres-Saumeth, K. M. (2021). Corporate Social Responsibility in the pharmaceutical industry. *Estudios De Administracion*, 28(1), 32-60. <https://doi.org/10.5354/0719-0816.2021.59650>
- [7] Oger, C. (2009). Corporate social responsibility in the pharmaceutical industry : between trend and necessity (Thesis). Toronto Metropolitan University. <https://doi.org/10.32920/ryerson.14651817.v1>
- [8] Min, M., Desmoulins-Lebeault, F., & Esposito, M. (2017). Should pharmaceutical companies engage in corporate social responsibility? *Journal of Management Development*, 36(1), 58-70. <https://doi.org/10.1108/JMD-09-2014-0103>
- [9] Commission of the European Communities. (2001). *Green paper: promoting a European framework for corporate social responsibility (COM(2001) 366 final)*. Brussels: E. Commission.
- [10] Kirsanov, D. (2022, October 31). Aptechnyi prodazh za pidsumkamy 9 mis 2022 r. [Pharmacy sales according to the results of the 9th month of 2022]. *Apteka online.ua*, (37/38). <https://www.apteka.ua/article/649730>
- [11] JSC Farmak. <https://farmak.ua/>
- [12] PrJSC "Pharmaceutical Firm "Darnitsa". <https://www.darnitsa.ua/>
- [13] ARTERIUM. <https://www.arterium.ua/>
- [14] JSC "Kyiv Vitamin Plant". <https://www.vitamin.com.ua/ua/>
- [15] Cusum Pharm, LTD. <https://kusum.ua/>
- [16] Pharmaceutical Company "Zdorovia", LTD. <https://zt.com.ua/>
- [17] Yuriya-Pharm, LTD. <https://www.uf.ua/>
- [18] InterChem, SLC. <https://interchem.ua/>
- [19] PJSC SIC "Borshchahivskiy CPP". <http://bcpp.com.ua/>
- [20] Paskhaver, O. J., Verkhodova, L. T., & Aheieva, K. M. (2007). *Svitovyi dosvid dlia Ukrainy: vzaiemovidnosyny velykoho kapitalu z vladoiu i suspilstvom* [World experience for Ukraine: the relationship of big capital with the government and society]. Tsentr ekonomichnoho rozvytku. [in Ukrainian].
- [21] Del Castillo, M., Penagos, J., Navarro-Beltran, J., Polo, B., & Berrío, Y. (2011). [Methodological Strategies for Design and Implementation of the Programs of Corporate Social Responsibility in a Pharmaceutical Company Sector]. *Ingeniare*, (11), 45-52. <https://doi.org/10.18041/1909-2458/ingeniare.11.644>
- [22] Haro-de-Rosario, A., Saraite, L., Gálvez-Rodríguez, M. & Caba-Pérez, M. (2016). La industria farmacéutica ante la demanda de responsabilidad social corporativa [The pharmaceutical industry in light of the demand for corporate social responsibility]. *Perspectiva Empresarial*, 3(1), 55-75. <https://doi.org/10.16967/rpe.v3n1a1>
- [23] Demir, M., & Min, M. (2019). Consistencies and discrepancies in corporate social responsibility reporting in the pharmaceutical industry. *Sustainability Accounting, Management and Policy Journal*, 10(2), 333-364. <https://doi.org/10.1108/SAMPJ-03-2018-0094>
- [24] Bratishko, Yu. S. (2021). *Teoretychni ta praktychni pidkhody do upravlinnia systemoiu sotsialnoi vidpovidalnosti u farmatsii* [Theoretical and practical approaches to managing the system of social responsibility in pharmacy (Doctoral Dissertation)]. National Pharmaceutical University, Kharkiv, Ukraine.
- [25] Smith, A. D. (2008). Corporate social responsibility practices in the pharmaceutical industry. *Business Strategy Series*, 9(6), 306-315. <https://doi.org/10.1108/17515630810923612>
- [26] Vitezic, N. (2010). A Measurement System of Corporate Social Responsibility in the Pharmaceutical Industry of the Region. *International Journal of Management & Information Systems (IJMIS)*, 14(5), 57-68. <https://doi.org/10.19030/ijmis.v14i5.13>
- [27] Droppert, H., Bennett, S. (2015). Corporate social responsibility in global health: An exploratory study of multinational pharmaceutical firms. *Global Health*, 11(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s12992-015-0100-5>
- [28] Janga, A. (2018). Corporate social responsibility in the pharmaceutical industry – a review of pharmaceutical companies in the United States and India. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 8(1), 363-368. https://www.ijpbs.com/ijpbsadmin/upload/ijpbs_5ac12d90df64b.pdf
- [29] Dănescu, T., & Popa, M. A. (2020). Public health and corporate social responsibility: exploratory study on pharmaceutical companies in an emerging market. *Globalization and health*, 16(1), 117. <https://doi.org/10.1186/s12992-020-00646-4>
- [30] Bae, G., Ahn, J. H., Lim, K. M., & Bae, S. (2022). Corporate social responsibility of pharmaceutical industry in Korea. *Frontiers in pharmacology*, 13, 950669. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.950669>
- [31] Lee, H., Kim, S. Y., Kim, G., & Kang, H. Y. (2019). Public preferences for corporate social responsibility activities in the pharmaceutical industry: Empirical evidence from Korea. *PLoS one*, 14(8), e0221321. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221321>
- [32] Qian, Y. (2016). *Corporate Social Responsibility Practices of Pharmaceutical Companies in China: A Scale Development & Empirical Study*. PhD thesis. Retrieved from <https://repositorio.iscte-iul.pt/handle/10071/13287>
- [33] Yang, M., Wang, J., Maresova, P., & Akbar, M. (2022). Can the spending of corporate social responsibility be offset? Evidence from pharmaceutical industry. *Economic Research-Ekonomiska Istrazivanja*, 35(1), 6279-6303. <https://doi.org/10.1080/1331677X.2022.2048194>
- [34] Tsutsui, H. (2018). Factors Associated with Corporate Social Responsibility Reporting in Japanese Pharmaceutical Companies. WWU Honors Program Senior Projects. https://cedar.wvu.edu/wwu_honors/80
- [35] Silva Filho, C. F., Benedicto, S. C. D., Sugahara, C. R., & Georges, M. R. R. (2019). Corporate Social Responsibility of Pharmaceutical Industry in Brazil. *International Journal of Humanities and Social Science*, 9(1). <https://doi.org/10.30845/ijhss.v9n1p4>
- [36] Senthil Vadivu, S., & Raja, S. S. (2015). Corporate Social Responsibility of Pharmaceutical Companies in India. *International Research Journal of Business and Management*, 8(2), 15-19.
- [37] Nair, S. (2016). Corporate social responsibility of pharmaceutical companies in India. *International Journal of Applied Research*, 2(10), 163-166. <https://www.allresearchjournal.com/archives/2016/vol2issue10/PartC/2-9-106-542.pdf>
- [38] Vijayabanu, C., Vijayanand, V., Sai Prashanthi, S., Rajesh Kumar, R., Subaash, R., & Madhussodhanan. (2018). Corporate social responsibility (CSR) - A study with special reference to Indian pharma industry. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 11(4), 1663-1666. <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2018.00309.8>
- [39] Tkachenko, N. O. (2013). Analiz modelei sotsialnoi vidpovidalnosti farmatsevychnoho biznesu [The analysis of social responsibility models in pharmaceutical business]. *Farmatsevychnyi Zhurnal*, (1), 9-14. [in Ukrainian].
- [40] Tkachenko, N. O. (2018). *Sotsialna vidpovidalnist u profesiinii diialnosti farmatsevychnykh pratsivnykiv* [Social responsibility in the professional activity of pharmaceutical workers]. Zaporizhzhia : ZDMU. [in Ukrainian].
- [41] Tkachenko, N. O. (2018). Vprovadzhennia kontseptsii sotsialnoi vidpovidalnosti v diialnist farmatsevychnykh orhanizatsii [Introduction of the concept of social responsibility in the activity of pharmaceutical organizations]. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*, 11(2), 238-244. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2018.2.133498>
- [42] Tkachenko, N. O., Hromoviy, B. P., & Knysch, E. H. (2015, May 22). Sotsialna vidpovidalnist fakhivtsiv farmatsii yak bazovyi element sotsialnoi vidpovidalnoi povedinky farmatsevychnykh orhanizatsii [Social responsibility of pharmacy specialists as a basic element of socially responsible behavior of pharmaceutical organizations]. *Upravlinnya yakistyu v farmatsiyi*. Collection of materials of the 9th scientific and practical conference (pp. 127-128). Kharkiv: NFAU. [in Ukrainian].
- [43] Tkachenko, N. O., & Hromoviy, B. P. (2017). Kontseptualnyi analiz sotsialnoi vidpovidalnosti osobystosti ta yii intehruvannia u farmatsevychnu praktyku [Conceptual analysis of social responsibility of the person and its integration in pharmaceutical practice]. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*, 10(3), 342-347. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2017.3.113624>
- [44] Tkachenko, N. O., & Hromoviy, B. P. (2018). Modeliuvannia pravovoho polia formuvannia sotsialnoi vidpovidalnoi povedinky farmatsevychnykh fakhivtsiv [Modeling the legal field of formation of socially responsible conduct among pharmacy specialists]. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*, 11(1), 104-111. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2018.1.123729>
- [45] Posylkina, O. V., & Bratishko, Yu. S. (2016). Analiz suchasnykh tendentsii v upravlinni sotsialnoiu vidpovidalnistiu farmatsevychnykh

- pidpriemstv [The analysis of current trends in management of social responsibility of pharmaceutical enterprises]. *Sotsialna farmatsiia v okhoroni zdorovia*, 2(3), 5-17. [in Ukrainian].
- [46] Posylkina, O. V., & Bratishko, Yu. S. (2018). Analiz rehuliatornoj bazy upravlinnia sotsialnoiu vidpovidalnistiu farmatsevychnykh pidpriemstv [Regulatory base analysis of managing the pharmaceutical companies social responsibility]. *Upravlinnia, ekonomika ta zabezpechennia yakosti v farmatsii*, (1), 28-34. [in Ukrainian].
- [47] Tkachenko, N. O. (2020). Doslidzhennia stanu ta napriamiv sotsialnoi aktyvnosti subyektiv farmatsevychnoho pidpriemnytstva [The study of the state and directions of the social activity of pharmaceutical entrepreneurship]. *Upravlinnia, ekonomika ta zabezpechennia yakosti v farmatsii*, (3), 47-56. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.24959/uekj.20.23>
- [48] Profesiina asotsiatsiia korporatyvnoho upravlinnia. (2020). *ESG transparency index 2020 Ukraine*. [in Ukrainian]. https://cgpa.com.ua/wp-content/uploads/2022/02/Transp_indeks_2020-FULL_ua_web.pdf
- [49] Yevtushenko, O. V. (2013). Otsinka korporatyvnoi sotsialnoi vidpovidalnosti: metody, obiekty, pokaznyky [Assessment of corporate social responsibility: methods, objects, indicators]. *Visnyk natsionalnoho tekhnichnoho universytetu "KhPI"*, 46, 53-63. [in Ukrainian].
- [50] Kharchuk, V. Yu. (2020). Analizuvannia mizhnarodnykh standartiv iz harmoniinoho rozvytku [Analysis of international standards for sustainable development]. *Ekonomika ta pidpriemnytstvo*, (6), 111-117. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.32840/1814-1161/2020-6-17>
- [51] Global Reporting Initiative. (n.d.). Resource center. Standards. <https://www.globalreporting.org/how-to-use-the-gri-standards/resource-center/>
- [52] AccountAbility. (n.d.). Standards. <https://www.accountability.org/standards/>
- [53] SA8000:2014 Standard. <https://sa-intl.org/resources/sa8000-standard/>
- [54] ISO 1400. Standards. <https://www.iso.org/iso-14001-environmental-management.html>
- [55] The Stakeholder Alliance (n.d.). *The Sunshine Standards*. <https://www.capponline.org/sunstds.html>
- [56] Bratishko, Yu. S., & Posylkina, O. V., & Novgorodska, L. M. (2016). *Metodyka otsinky rivnia sotsialnoii vidpovidalnosti farmatsevychnykh pidpriemstv: metodychni rekomendatsii* [Methodology for assessing the level of social responsibility of pharmaceutical enterprises: Guidelines]. Kyiv. [in Ukrainian].



Клінічний випадок діагностики автоімунного гепатиту на стадії цирозу печінки

О. А. Світлицька¹, О. В. Рябоконт¹, А. О. Світлицький¹, Н. Г. Горбаткова², Е. В. Котляревська²

¹Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна, ²Навчально-науковий медичний центр «Університетська клініка» Запорізького державного медико-фармацевтичного університету, Україна

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті; F – остаточне затвердження статті

Мета роботи – проаналізувати клінічний випадок діагностики автоімунного гепатиту (АІГ) на стадії цирозу печінки в пацієнтки віком 40 років і нагадати лікарям-практикам про тяжкі наслідки цієї хвороби.

Матеріали та методи. Проаналізовано клінічний випадок АІГ, діагностованого згідно з критеріями International Autoimmune Hepatitis Group (2008) на стадії цирозу печінки у пацієнтки віком 40 років. Для верифікації діагнозу здійснили пункційну біопсію печінки з морфологічним дослідженням гепатобіоптату.

Результати. Аналіз клінічного випадку АІГ у пацієнтки 40 років продемонстрував пізню діагностику АІГ на стадії цирозу печінки, що спричинена відсутністю протягом тривалого часу будь-яких клінічних проявів хвороби та настороженості практичних лікарів щодо з'ясування причин тривалого підвищення активності трансаміназ. Тригером маніфестації клінічних проявів цирозу печінки, що сформувався внаслідок тривалого перебігу АІГ, було емоційне перенапруження через виїзд із зони бойових дій.

Показано застосування критеріїв International Autoimmune Hepatitis Group у клінічній практиці, зокрема поєднання підвищення антинуклеарних антитіл і загального IgG, характерних гістологічних змін у печінці, виключення інфікування гепатотропними вірусами дало змогу вважати діагноз АІГ достовірним.

Медикаментозне лікування сприяло певним позитивним змінам клінічних і лабораторних показників, але за висновком лікаря-трансплантолога на цьому етапі перебігу АІГ пацієнтка вже потребувала трансплантації печінки, тому включена в лист очікування.

Висновки. Наведене клінічне спостереження демонструє пізню діагностику АІГ на стадії цирозу печінки в пацієнтки віком 40 років, що протягом тривалого часу не мав клінічних проявів, і тому не викликав належної настороженості лікарів щодо з'ясування причин тривалого підвищення активності трансаміназ. Вірогідність діагнозу АІГ підтверджено шляхом застосування критеріїв International Autoimmune Hepatitis Group.

Ключові слова: автоімунний гепатит, цироз печінки, трансамінази, автоантитіла, діагностика, лікування.

Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2023. Т. 16, № 2(42). С. 194-200

A clinical case of diagnosis of autoimmune hepatitis at the stage of liver cirrhosis

O. A. Svitlytska, O. V. Riabokon, A. O. Svitlytskyi, N. H. Horbatkova, E. V. Kotliarevska

The aim of the work is to analyze a clinical case of autoimmune hepatitis (AIH) diagnosis at the stage of cirrhosis in a 40-year-old female patient and to remind practicing doctors about the serious consequences of this disease.

Materials and methods. A clinical case of AIH diagnosed according to the criteria of the International Autoimmune Hepatitis Group (2008) at the stage of cirrhosis in a 40-year-old female patient was analyzed. A puncture liver biopsy with a morphological study of the hepatobiopate was also performed to verify the diagnosis.

Results. The analysis of the clinical case of AIH in a 40-year-old female patient revealed a delayed diagnosis of AIH at the cirrhosis stage. This was due to the absence of any clinical symptoms of the disease for a long period of time, and the lack of attention of practicing doctors in investigating the reasons for the long-term increase in transaminase activity. The trigger factor for the clinical manifestations of cirrhosis, which developed due to the long-term course of AIH, was emotional stress resulting from leaving the combat zone.

The application of the International Autoimmune Hepatitis Group criteria in clinical practice was demonstrated, specifically the combination of elevated antinuclear antibodies and total IgG, characteristic histological changes in the liver, and exclusion of hepatotropic viral infections, which allowed for a reliable diagnosis of AIH.

ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/277495>

UDC 616.36-002-004-097.1-07
DOI: 10.14739/2409-2932.2023.2.277495

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(2), 194-200

Key words: autoimmune hepatitis, cirrhosis, transaminases, autoantibodies, diagnosis, treatment.

*E-mail: svitlytska.ok@gmail.com

Received: 21.04.2023 // Revised: 26.04.2023 // Accepted: 10.05.2023

Medical treatment resulted in certain positive changes in clinical and laboratory indicators. However, according to the transplant doctor's opinion, at this stage of the AIH course, the patient required a liver transplant and therefore was added to the waiting list.

Conclusions. This clinical case highlights the late diagnosis of AIH at the cirrhosis stage in a 40-year-old female patient due to the absence of clinical manifestations over several years and the lack of vigilance among doctors, possibly primary care physicians or specialists, to investigate the persistent increase in transaminase activity. The application of the International Autoimmune Hepatitis Group criteria helped confirm the diagnosis of AIH.

Key words: autoimmune hepatitis, cirrhosis, transaminases, autoantibodies, diagnosis, treatment.

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(2), 194-200

Автоімунний гепатит (АІГ) – тяжке, недостатньо вивчене хронічне автоімунне запальне захворювання печінки невідомої етіології. Належить до рідкісних захворювань, не має патогномонічної симптоматики, швидко прогресує до цирозу печінки та стає причиною зниження якості життя, порушення працездатності та інвалідизації хворих [1,2]. Для АІГ характерне хронічне запально-некротичне ураження гепатоцитів із перипортальним або поширеним запальним процесом у печінці, наявність гіпергаммаглобулінемії та тканинних автоантитіл. Широка варіабельність клінічної симптоматики АІГ, недостатня вивченість факторів, що спричиняють захворювання, суттєво ускладнюють його ранню діагностику, відтермінують початок лікування, негативно впливаючи на прогноз [2]. Незважаючи на те, що стандартна імуносупресивна терапія значно покращує загальну виживаність пацієнтів з АІГ, віддалена смертність залишається високою з показником 10-річної загальної смертності від 5% до 26% у різних когортах пацієнтів [3].

Захворюваність на АІГ останнім часом зростає у всьому світі [4]. За даними сучасної фахової літератури, в США АІГ має поширеність 45 на 100 000 у жінок і 14 на 100 000 у чоловіків; має два піки, що припадають на вік 10–30 і 40–60 років [5]. Аналогічні статистичні дані наводять і інші дослідники [4]. За даними European Association for the Study of the Liver (2015), захворюваність на АІГ у жінок вп'ятеро вища, ніж у чоловіків [6]. Поширеність АІГ неоднакова в різних географічних регіонах, коливається від 4,8 до 42,9 на 100 000 населення [7]. За даними інших дослідників, рівень захворюваності в дорослих коливається від 0,67 (південь Ізраїлю) до 2 випадків на 100 000 населення щорічно (регіон Кентербері, Нова Зеландія) [8].

Істотна гетерогенність клінічних проявів і відносно рідкісні випадки захворювання призводять до того, що АІГ залишається складною діагностичною і терапевтичною проблемою.

Мета роботи

Проаналізувати клінічний випадок діагностики автоімунного гепатиту на стадії цирозу печінки в пацієнтки віком 40 років і нагадати лікарям-практикам про тяжкі наслідки цієї хвороби.

Матеріали і методи дослідження

Проаналізували клінічний випадок АІГ на стадії цирозу печінки в пацієнтки Г., 40 років. Хвора обстежена й пере-

бувала на стаціонарному лікуванні на базі Навчально-наукового центру «Університетська клініка» Запорізького державного медичного університету.

Пацієнтку обстежили й призначили терапію згідно з наказом МОЗ України від 06.11.2014 р. № 826 «Про затвердження та впровадження медико-технологічних документів зі стандартизації медичної допомоги при хронічних неінфекційних гепатитах» [2].

Діагноз АІГ встановили за критеріями International Autoimmune Hepatitis Group (2008): наявністю автоантитіл, підвищенням γ -глобулінів, гістологічними ознаками АІГ, виключене вірусне ураження печінки [1]. Для верифікації діагнозу АІГ здійснили пункційну біопсію печінки з наступним морфологічним дослідженням гепатобіоптату (патоморфолог – Г. С. Лапсарь).

Результати

Клінічний випадок. Пацієнтка Г. (1982 р. н.) 10.06.2022 р. звернулась до Навчально-наукового центру «Університетська клініка» Запорізького державного медичного університету зі скаргами на відчуття важкості в правому підбер'ї, збільшення живота в об'ємі, тяжкість в епігастрії після їди, набряки нижніх кінцівок, виражену слабкість, втомлюваність, порушення сну (безсоння вночі), інверсію сну, апатію, легкий тремор пальців кистей.

З анамнезу відомо, що раніше не хворіла на вірусні гепатити, не мала шкідливих умов праці. В 2008 році вперше зареєстровано незначне підвищення показників печінкових проб, зокрема аланінамінотрансферази (АлАТ) до 0,8 ммоль/л, аспартатамінотрансферази (АсАТ) до 0,6 ммоль/л, загального білірубіну до 30 ммоль/л, скарг на той час не було. За результатами обстеження, маркери вірусних гепатитів В (HBsAg) і С (anti-HCV) негативні. Після курсу дезінтоксикаційної та гепатопротекторної терапії показники трансаміназ і білірубіну нормалізувалися. Надалі періодично контролювала показники активності трансаміназ, інколи виявляли підвищення активності АлАТ і АсАТ у межах 1,5–2,0 норм, але лікування не отримувала. Під час ультразвукового дослідження (УЗД) в 2012 році виявили збільшення розмірів селезінки, однак дообстеження не було рекомендовано. Надалі періодично (кожні 2–3 роки) під час обстеження фіксували наведені зміни, спостерігали збільшення розмірів печінки за даними УЗД. Пацієнтка самостійно приймала різні гепатопротектори.

Різде погіршення стану відбулося впродовж останнього місяця до госпіталізації на тлі емоційного пере-

Таблиця 1. Показники автоімунного профілю хворої Г. віком 40 років

Показник, одиниці вимірювання	Референтні значення	Показники хворої
Антинуклеарні антитіла IgG, ОД	<1,1	8,90
Антитіла до фосфоліпідів IgM, ОД/мл	<10,0	10,21
Антитіла до фосфоліпідів IgG, ОД/мл	<10,0	0,75
Антитіла до мітохондрій (АМА-М2), ОД/мл	<10,0	2,19
Загальний IgG, г/л	6,5–16	18,1

напруження (виїзд із зони бойових дій у Запорізькій області). З'явилися і посилювались наведені скарги, з якими пацієнтка звернулася до Університетської клініки. Під час амбулаторного обстеження від 06.06.2022 р. виявили слабо виражений цитолітичний синдром із підвищенням активності АЛАТ (46 ОД/л) і АсАТ (64 ОД/л), ознаки синдрому внутрішньопечінкового холестазу з підвищенням активності лужної фосфатази до 234 ОД/л, гіпоальбумінемію – на рівні 31 г/л, показник альфа-фетопротейну становив 4,0 нг/мл. Повторне обстеження на маркери вірусних гепатитів, а саме HBsAg та anti-HCV дало негативні результати. Під час УЗД органів черевної порожнини від 06.06.2022 р. виявили ознаки асцити, спленомегалії, портальної гіпертензії, дифузні зміни паренхіми печінки за типом цирозу печінки, потовщення стінок жовчного міхура. Для дообстеження та визначення тактики лікування пацієнтка госпіталізована в відділення мультимодальної патології Університетської клініки.

На час госпіталізації при об'єктивному огляді шкіра бліда, елементів висипу немає; визначили помірно виражені набряки нижніх кінцівок у ділянці гомілок і стоп. Живіт збільшений внаслідок асцити, м'який, безболісний. Печінка збільшена на 3 см, нижній край печінки гострий, бугристий, безболісний. Селезінка збільшена на 3 см.

Під час лабораторного обстеження виявили ознаки залізодефіцитної анемії легкого ступеня: зниження рівня гемоглобіну до 105 г/л, зменшення середнього розміру еритроцитів до 76,6 fl, зниження рівня сироваткового заліза до 6,5 ммоль/л, підвищення ШОЕ до 23 мм/год. У біохімічному аналізі крові на тлі нормальних показників загального білірубину та тимолової проби активність трансаміназ становила: АЛАТ – 21 ОД/л, АсАТ – 38 ОД/л. Зафіксовано помірно виражені ознаки синдрому внутрішньопечінкового холестазу з активністю гаммаглутамілтранспептидази (56 ОД/л) і лужної фосфатази (171 ОД/л). У протеїнограмі – ознаки гіпопротеїнемії зі зниженням рівня загального білка до 55,6 г/л та гіпоальбумінемії до 24,7 г/л. Вміст креатиніну – 113 мкмоль/л, показник швидкості клубочкової фільтрації – 52,6 мл/хв. Рівень електролітів крові та параметри коагулограми – у межах референтних значень.

Під час фіброезофагогастроуденоскопії виявили ознаки застійної гастропатії. Здійснили біопсію слизової оболонки шлунка, гістологічно зафіксували ознаки хронічного атрофічно-гіперпластичного неактивного гастриту з вогнищевою тонко- та товстокишковою ме-

таплазією епітелію залоз, слабо вираженим фіброзом і вогнищами лімфоїдної інфільтрації у власній пластинці слизової. Дослідження на *Helicobacter pylori* методом уреазного хелік-тесту дало негативний результат.

Враховуючи молодий вік пацієнтки, виключення низки етіологічних чинників ураження печінки, зокрема вірусного (маркери вірусних гепатитів негативні), токсичного (не вживала алкоголь, не приймала медикаменти з потенційним гепатотоксичним ефектом, не мала шкідливих факторів на виробництві), метаболічного (не виявили ознаки метаболічного синдрому, індекс маси тіла – 24,1 кг/м²) генезу, здійснили обстеження для підтвердження імовірного автоімунного генезу ураження печінки. У результаті аналізу спектра автоантитіл виявили різко позитивні антинуклеарні антитіла IgG та антитіла до фосфоліпідів IgM, а також високий рівень загального IgG (табл. 1).

Отже, за критеріями діагностики АІГ International Autoimmune Hepatitis Group (2008), у пацієнтки діагноз АІГ достовірний (7 балів). Це підтвердило поєднання таких ознак: підвищення антинуклеарних антитіл (1 бал), підвищення загального IgG (2 бали), типова для АІГ гістопатологічна картина (2 бали), підтверджена відсутність вірусного гепатиту (2 бали).

Враховуючи результати обстеження, встановили діагноз: цироз печінки клас В за Чайлд–П'ю внаслідок АІГ (ANA позитивні, IgM до фосфоліпідів позитивні); синдром портальної гіпертензії; асцит; спленомегалія; хронічна печінкова енцефалопатія 0–I ступеня.

Пацієнтці здійснили трепанобіопсію печінки. Під час гістологічного дослідження встановлено: матеріал біопсії представлений тканиною печінки з порушенням білкової гістоархітекτονіки, печінково-клітинні пластинки завтовшки 2–3 клітини, з наявністю декількох чітко відмежованих регенераторних вузлів. Виявили портальні та перипортальні фіброзні зміни з протоковою реакцією, з поширенням на тканину часточки та формуванням фіброзних септ. Спостерігали помірно виражену лімфогістіоцитарну інфільтрацію стромы портальних трактів із наявністю нейтрофілів, незначною інтерфейсною активністю. В гепатоцитах I зони визначили також накопичення невеликої кількості міді, що є ознакою хронічного холестазу.

Патоморфологічний висновок: хронічний гепатит з вираженими фіброзними змінами, цирозом; ступінь активності 2/4, стадія фіброзу 4/4 за Batts-Ludwig, стадія фіброзу 6/6 за Ishak, 4B/4C за Laënnec.

В умовах стаціонара (з 10.06.2022 р. до 22.06.2022 р.) пацієнтка отримала терапію: аргініну глутамат 2000 мг на добу внутрішньовенно крапельно 10 днів, адеметіонін 1000 мг на добу внутрішньовенно крапельно 7 днів, етамзилат 50 мг внутрішньовенно струминно 7 днів, лактулозу 30 мл зранку per os, торасемід 20 мг зранку per os, пантопразол 40 мг на добу per os, спіронолактон 100 мг зранку per os, урсодезоксихолеву кислоту 250 мг двічі на добу per os. Враховуючи підтверджений автоімунний генез гепатиту, виражені клінічні прояви під час маніфестації, широкий спектр і високий вміст автоантитіл, призначили терапію метилпреднізолоном в дозі 8 мг на добу.

На тлі лікування протягом місяця стан пацієнтки поступово покращився, регресували ознаки асцити, набряковий синдром, зменшився астеничний синдром, зникли ознаки печінкової енцефалопатії. Лабораторні аналізи: зменшився рівень лужної фосфатази до 134 Од/л, рівень IgG знизився до 16 г/л. Зберігалась легка анемія – рівень гемоглобіну 115 г/л; зменшилася тромбоцитопенія до 110×10^9 /л. Рівень альбумінів сироватки крові мав чітку тенденцію до підвищення, але залишався нижчим за референтні значення (30,5 г/л). Враховуючи результати лікування, знизили дозу метилпреднізолону до 4 мг на добу, пролонгували приймання спіронолактону 200 мг на добу, лактулози по 30 мл зранку, адеметіоніну по 500 мг per os двічі на добу, урсодезоксихолевої кислоти по 300 мг двічі на добу, торасеміду 20 мг зранку 1–2 рази на тиждень.

Пацієнтку проконсультував трансплантолог, вона зареєстрована в листі очікування трансплантації печінки.

Обговорення

Наведене клінічне спостереження демонструє тривалість безсимптомного перебігу АІГ з наступною маніфестацією клінічних ознак лише на стадії цирозу печінки.

Відомо, що діагностика АІГ складна, а успіх лікування захворювання залежить від своєчасності встановлення діагнозу та призначення імуносупресивної терапії, що є єдиним дієвим способом лікування. АІГ – тяжке рецидивне імуніопосередковане агресивне захворювання печінки [9]. Незважаючи на те, що це відносно рідкісна патологія печінки, кількість хворих на АІГ з кожним роком збільшується [1]. Виникнення АІГ певною мірою генетично зумовлене, спричинене взаємодією спадкових, імуніологічних чинників, а також зовнішніх тригерів [10]. Вважають, що вплив навколишнього середовища відіграє більшу роль, ніж генетика у формуванні імуніопатологічних реакцій. Специфічні чинники довкілля, як-от вірусні інфекції або вплив ксенобіотиків, можуть діяти як тригери для втрати самотолерантності до автоантігенів в осіб, генетично схильних до АІГ [11].

АІГ діагностують у будь-якому віці й у всіх етнічних групах, але його прояви мають певні особливості в осіб різної етнічної належності. Так, корінні жителі Аляски мають високу частоту виникнення жовтяниці при АІГ, серед латиноамериканців найвищий відсоток хворих

із цирозом печінки внаслідок АІГ, а в афроамериканців частіше реєструють швидкі темпи прогресування захворювання та більшу частоту рецидивів після імуносупресивної терапії [12]. У структурі хворих на АІГ переважають жінки: і в дитячому (60–76 % дівчат), і в дорослому (71–95 % жінок) віці [13].

Ризик виникнення АІГ асоціюється з генетичними поліморфізмами, що кодують цитотоксичний Т-лімфоцитний антиген-4, фактор некрозу пухлини- α , кластер диференціювання CD95 або антиген апоптозу, рецептор вітаміну D, перетворювач сигналу та активатор транскрипції, трансформувальний фактор росту- β , інгібуєчий фактор міграції макрофагів, білок адаптера SH2B, член сімейства доменів рекрутування каспази та рецептор інтерлейкіну-23 тощо. Дисфункціональні продукти генетичних варіантів або дефіцитні рівні генного продукту можуть порушити гомеостатичні механізми, що впливають на проліферацію та виживання аутореактивних Т- і В-лімфоцитів, спричиняючи дисбаланс продукції цитокінів; це, відповідно, модулює запальні й імунні реакції [10].

Діагноз АІГ ґрунтується на гістологічних аномаліях, характерних клінічних і лабораторних результатах, а саме на підвищенні активності АсАТ і АлАТ, високому вмісті IgG в сироватці, а також наявності одного або кількох характерних автоантитіл, підвищенні вмісту γ -глобулінів тощо. АІГ не має характерного діагностичного маркера, встановлення діагнозу відбувається насамперед шляхом виключення інших захворювань, що можуть бути схожими на нього (вірусний гепатит, медикаментозне ураження печінки, хвороба Вільсона, спадковий гемохроматоз тощо) [10–13]. Характерні прояви АІГ – виражена активність некрозапального процесу в печінці, переважання ознак синдрому цитолізу над ознаками синдрому внутрішньопечінкового холестазу, відсутність вірусних та алкогольних уражень печінки, обструкції біліарної протокової системи тощо [15]. Сучасні знання підтверджують багатоетапну робочу модель імуніопатогенезу АІГ, в якій порушення власної толерантності до автоантігенів гепатоцитів ініціює імуніопатологічні реакції, що призводять до прогресивного некрозапального процесу в печінці й активації фіброгенезу з прогресуванням фіброзу надалі до формування цирозу печінки [14].

Діагноз АІГ не можна визначити без біопсії печінки та відповідних гістологічних результатів. Гістологічні ознаки АІГ – інфільтрація плазматичними клітинами у 66 % випадків, лобулярний гепатит у 47 %. Центрилобулярний некроз виявляють у 29 % випадків, з однаковою частотою в пацієнтів із цирозом печінки та без нього [16]. Емпериоплез (проникнення однієї неушкодженої клітини в іншу неушкоджену клітину зі збереженням життєздатності обох клітин) спостерігають у 65 % пацієнтів з АІГ, а розетки гепатоцитів виявляють у 33 %. Жодна з окремих гістологічних характеристик не є специфічною для АІГ, але ознаки гепатиту з портальними лімфоцитарними або лімфоплазмоцитарними клітинами, що поширюються на часточку, емпериоплез і розетки, вважають типовими для АІГ [17].

Якщо немає даних біопсії (доволі часто в рутинній практиці), застосування вірогідних критеріїв для встановлення діагнозу АІГ обмежується [15]. Зазначимо, що для підтвердження діагнозу АІГ значущим є виявлення автоімунних маркерів, але їхній спектр дуже широкий. Доступними в Україні є антинуклеарні антитіла (ANA), антитіла до мікросом печінки і нирок (анти-LKM), гладком'язових клітин (SMA), розчинних печінкових (SLA) і печінково-панкреатичних (LP) антигенів, цитозольного антигена печінки типу 1 (анти-LC1) та асіалоглікопротеїнових рецепторів (Anti-ASGPR) [18].

Залежно від спектра аутоантитіл розрізняють підтипи АІГ. Так, два основні типи розрізняють залежно від специфічних аутоантитіл [19]: АІГ 1 типу характеризується підвищенням ANA та/або SMA/антиактинових антитіл, а тип 2 характеризується зростанням анти-LKM1, як правило, без ANA і SMA. Крім того, до 20 % випадків АІГ є негативними на аутоантитіла ANA, SMA та LKM1, незважаючи на наявність інших характерних ознак АІГ (так званий серонегативний АІГ). Класифікація АІГ за типами допомагає під час лікування та прогнозування результатів у дітей, але менш інформативне для дорослих [20]. ANA, SMA та анти-LKM1 є традиційним серологічним профілем для діагностики АІГ [14]. ANA виявляють у 80 % дорослих у Північній Америці з АІГ на час звернення, SMA – у 63 %, а анти-LKM1 позитивні у 3 % хворих на АІГ. За даними фахової літератури, 49 % пацієнтів з АІГ мають позитивні ANA, SMA або анти-LKM1 як ізольовану серологічну знахідку під час звернення, відповідно, 51 % хворих мають широкий спектр позитивних аутоантитіл. Підвищення ANA також може виникати як ізольована серологічна ознака при первинному склерозувальному холангіті (29 %), хронічному гепатиті С (26 %), хронічному гепатиті В (32 %), неалкогольній жировій хворобі печінки (34 %) та хронічному алкогольному захворюванні печінки (21 %). Можливе виявлення SMA як ізольованої серологічної ознаки при первинному склерозувальному холангіті (6 %), хронічному гепатиті С (6 %) і хронічному алкогольному захворюванні печінки (4 %). ANA та SMA одночасно визначають у менш ніж у 10 % хворих із патологією печінки за межами АІГ, а діагностична точність для АІГ покращується з 58 % до 74 % в разі виявлення двох типів аутоантитіл [21].

Анти-LKM1 зазвичай виявляють, коли немає ANA та SMA; це спостереження обґрунтовує доцільність їх визначення після першого тестування на ANA та SMA [20]. Антитіла до SLA виявляють у 7–22 % пацієнтів з АІГ 1 типу, мають високу специфічність (99 %) для діагностики [22]. Анти-SLA були єдиними маркерами АІГ у 14–20 % пацієнтів, їхня наявність прямо корелювала з тяжким перебігом захворювання і рецидивом після скасування терапії [23]. Атипові перинуклеарні антинейтрофільні цитоплазматичні антитіла (pANCA) часто визначають у пацієнтів з АІГ 1 типу (50–92 %). Втім, вони не мають достатньої діагностичної специфічності, оскільки їхнє підвищення реєструють також при первинному склерозувальному холангіті, перехрест-синдромі, виразковому

коліті та в разі ураження печінки міноцикліном. Іноді атипові pANCA – єдині виявлені аутоантитіла [21–24].

Антитіла проти філаментозного (F) актину (антиактину) є підгрупою SMA, позитивні у 86–100 % пацієнтів з АІГ, а антитіла до α -актиніну – маркер, що позитивний у 42 % пацієнтів з АІГ [25].

Антитіла до печінкового цитозолу типу 1 (анти-LC1) позитивні у 32 % пацієнтів з позитивними анти-LKM1. Це переважно реєструють у дітей із тяжким перебігом АІГ. Анти-LKM3 виявляють у 17 % пацієнтів з АІГ 2 типу, вони можуть бути корисними для оцінювання серонегативних пацієнтів. Діагностичну значущість анти-LC1 і анти-LKM3 нині вивчають [20–25].

Титри аутоантитіл у дорослих і дітей дають змогу певною мірою орієнтуватися в тяжкості АІГ й оцінюванні відповіді на лікування, але вони не є чіткими біомаркерами активності захворювання або результату лікування [24]. Визначення антитіл має бути вибіркоким і відповідати клінічному фенотипу, що визначають. Можливе додаткове дослідження серологічних маркерів залежно від результатів попередніх тестів і відповідно до нових діагностичних можливостей. Діагностика АІГ ускладнена можливістю формування різних клінічних форм захворювання від фульмінантної печінково-клітинної недостатності до тривалого безсимптомного хронічного перебігу гепатиту з трансформацією в цироз печінки [24]. Пацієнти можуть звертатись до лікаря на будь-якій стадії захворювання, що найчастіше перебігає безсимптомно або єдиним проявом якого тривалий час є збільшення активності трансаміназ без суб'єктивної симптоматики [18,19]. За даними наукової літератури, цироз печінки внаслідок АІГ є сформованим у 28–33 % дорослих на час звернення (особливо в людей похилого віку) і в 38 % дітей [26]. Це суттєво підвищує ризик смертності та/або зумовлює необхідність трансплантації печінки [27].

Цироз печінки виникає у 40 % хворих на АІГ за наявності мультилобулярних некрозів або мостовидних некрозів [17,26]. Цироз печінки при АІГ може маніфестувати клінічними ознаками ускладнень: шлунково-кишковою кровотечею з варикозно розширених вен стравоходу, набряково-асцитичним синдромом, проявами печінкової енцефалопатії. У більшості хворих АІГ прогресує до цирозу печінки після кількох років імуносупресивної терапії, що не виключає періоди загострення захворювання [15]. Тому гістологічне дослідження під час звернення є важливим для виключення альтернативних або поєднаних захворювань, оцінювання тяжкості запальної активності та визначення стадії фіброзу.

У клінічному спостереженні, що навели, діагноз АІГ встановлений лише на стадії цирозу печінки, оскільки не виявляли значуще підвищення трансаміназ і майже не було клінічних проявів захворювання протягом тривалого часу. Лабораторні прояви гепатиту у хворої визначали протягом більше ніж 10 років, але дообстеження в повному обсязі не здійснили, спричинивши встановлення діагнозу АІГ лише на стадії цирозу печінки. Це зумови-

ло недостатню ефективність патогенетичної терапії та змусило спрямувати основні зусилля на симптоматичне лікування для усунення проявів декомпенсації цирозу печінки. Верифікацію діагнозу АІГ в пацієнтки здійснили за допомогою біопсії печінки, що відповідає вимогам сучасних рекомендацій і допомагає встановити тяжкість захворювання, наявність незворотних змін печінки [5].

Враховуючи молодий вік пацієнтки, активність запального процесу (за рівнем ІgG), хворій призначили імуносупресивну терапію – метилпреднізолон, що відповідає рекомендаціям European Association for the Study of the Liver [6]. Відсутність значного підвищення трансаміназ, високий рівень ІgG у пацієнтки свідчать, що захворювання сягає стадії неактивного («вигорілого») цирозу, коли значно знижується запальна активність, а ефективність імуносупресивної терапії знижується, залишаючи ризик побічних дій та ускладнень на тлі лікування [5,6]. Імовірно, це пояснює те, що призначення хворій метилпреднізолону не спричинило істотних змін вмісту ІgG у динаміці, засвідчуючи низьку ефективність патогенетичної терапії в цьому випадку. Тому основні зусилля під час лікування пацієнтки спрямовані на усунення клінічних проявів цирозу печінки та підготовку хворої до трансплантації печінки.

Висновки

1. Наведене клінічне спостереження демонструє пізню діагностику автоімунного гепатиту на стадії цирозу печінки в пацієнтки віком 40 років, що, з одного боку, спричинена відсутністю протягом тривалого часу клінічних проявів хвороби, а з іншого боку, відсутністю настороженості лікарів щодо з'ясування причин тривалого підвищення активності трансаміназ. У разі виключення вірусного та токсичного генезу хронічного гепатиту практичним лікарям слід пам'ятати про необхідність діагностики ймовірного автоімунного генезу ураження печінки.

2. У клінічному спостереженні показано застосування критеріїв чинних міжнародних рекомендацій International Autoimmune Hepatitis Group у практиці лікаря, зокрема поєднання підвищення антинуклеарних антитіл і загального ІgG, характерних гістологічних змін у печінці, виключення інфікування гепатотропними вірусами дало змогу вважати діагноз автоімунного гепатиту вірогідним.

Перспективи подальших досліджень полягають у продовженні накопичення й узагальнення клінічних спостережень хворих на автоімунний гепатит.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Відомості про авторів:

Світлицька О. А., канд. мед. наук, зав. відділення мультимодальної патології, Навчально-науковий медичний центр «Університетська клініка» Запорізького державного медико-фармацевтичного університету, Україна.
ORCID ID: 0000-0003-4987-8458

Рябокун О. В., д-р мед. наук, професор, зав. каф. інфекційних хвороб, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.
ORCID ID: 0000-0002-7394-4649

Світлицький А. О., канд. мед. наук, доцент каф. анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.
ORCID ID: 0009-0007-4523-0781

Горбаткова Н. Г., медичний директор, Навчально-науковий медичний центр «Університетська клініка» Запорізького державного медико-фармацевтичного університету, Україна.
ORCID ID: 0009-0000-1243-1797

Котляревська Е. В., директор, Навчально-науковий медичний центр «Університетська клініка» Запорізького державного медико-фармацевтичного університету, Україна.
ORCID ID: 0000-0001-8595-8389

Information about the authors:

Svitlytska O. A., MD, PhD, Head of the Multimodal Pathology Department, Educational and Scientific Medical Center "University Clinic" of Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.
Riabokun O. V., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Infectious Diseases, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

Svitlytskyi A. O., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Human Anatomy, Operative Surgery and Topographic Anatomy, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.
Horbatkova N. H., MD, Medical Director, Educational and Scientific Medical Center "University Clinic" of Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

Kotlyarevska E. V., MD, Director, Educational and Scientific Medical Center "University Clinic" of Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

References

- Hennes, E. M., Zeniya, M., Czaja, A. J., Parés, A., Dalekos, G. N., Krawitt, E. L., Bittencourt, P. L., Porta, G., Boberg, K. M., Hofer, H., Bianchi, F. B., Shibata, M., Schramm, C., Eisenmann de Torres, B., Galle, P. R., McFarlane, I., Dienes, H. P., Lohse, A. W., & International Autoimmune Hepatitis Group (2008). Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 48(1), 169-176. <https://doi.org/10.1002/hep.22322>
- Ministry of Health of Ukraine. (2014, November 6). *Pro zatverdzhennia ta vprovadzhenia medyko-tehnolohichnykh dokumentiv zi standartyzatsii medychnoi dopomohy pry khronichnykh neinfektsiynykh hepatytakh*. Nakaz MOZ Ukrainy vid 06.11.2014 r. No. 826 [On the approval and implementation of medical and technological documents on the standardization of medical care for chronic non-infectious hepatitis (No. 826)]. <https://ips.ligazakon.net/document/MOZ24038>
- Liang, J. B., Chen, Y., Chen, R. L., Li, Y. K., Li, B., You, Z. R., Li, Y., Zhang, J., Huang, B. Y., Wei, Y. R., Lyu, Z. W., Lian, M., Xiao, X., Wang, Q. X., Tang, R. Q., Fang, J. Y., Chen, X. Y., Ma, X., & Miao, Q. (2021). CD8+ T cells actively penetrate hepatocytes via the CD44/p-ERM/F-actin pathway in autoimmune hepatitis. *Journal of digestive diseases*, 22(6), 351-362. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12995>
- Heneghan, M. A., Yeoman, A. D., Verma, S., Smith, A. D., & Longhi, M. S. (2013). Autoimmune hepatitis. *Lancet*, 382(9902), 1433-1444. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62163-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62163-1)
- Tunio, N. A., Mansoor, E., Sheriff, M. Z., Cooper, G. S., Sclair, S. N., & Cohen, S. M. (2021). Epidemiology of Autoimmune Hepatitis (AIH) in the United States Between 2014 and 2019: A Population-based National Study. *Journal of clinical gastroenterology*, 55(10), 903-910. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000001449>
- European Association for the Study of the Liver (2015). EASL Clinical Practice Guidelines: Autoimmune hepatitis. *Journal of hepatology*, 63(4), 971-1004. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.06.030>
- Trivedi, P. J., & Hirschfield, G. M. (2021). Recent advances in clinical practice: epidemiology of autoimmune liver diseases. *Gut*, 70(10), 1989-2003. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322362>
- Czaja, A. J. (2017). Global Disparities and Their Implications in the Occurrence and Outcome of Autoimmune Hepatitis. *Digestive diseases and sciences*, 62(9), 2277-2292. <https://doi.org/10.1007/s10620-017-4675-y>

- [9] Singal, A. K., Louvet, A., Shah, V. H., & Kamath, P. S. (2018). Grand Rounds: Alcoholic Hepatitis. *Journal of hepatology*, 69(2), 534-543. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.05.001>
- [10] Mack, C. L., Adams, D., Assis, D. N., Kerkar, N., Manns, M. P., Mayo, M. J., Vierling, J. M., Alsawas, M., Murad, M. H., & Czaja, A. J. (2020). Diagnosis and Management of Autoimmune Hepatitis in Adults and Children: 2019 Practice Guidance and Guidelines From the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 72(2), 671-722. <https://doi.org/10.1002/hep.31065>
- [11] Floreani, A., Leung, P. S., & Gershwin, M. E. (2016). Environmental Basis of Autoimmunity. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 50(3), 287-300. <https://doi.org/10.1007/s12016-015-8493-8>
- [12] Palle, S. K., Naik, K. B., McCracken, C. E., Kolachala, V. L., Romero, R., & Gupta, N. A. (2019). Racial disparities in presentation and outcomes of paediatric autoimmune hepatitis. *Liver international*, 39(5), 976-984. <https://doi.org/10.1111/liv.14081>
- [13] Ngu, J. H., Bechly, K., Chapman, B. A., Burt, M. J., Barclay, M. L., Gentry, R. B., & Stedman, C. A. (2010). Population-based epidemiology study of autoimmune hepatitis: a disease of older women?. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 25(10), 1681-1686. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2010.06384.x>
- [14] Kfuri, M., & Schatzker, J. (2019). Response to A. Kumar, et al., Letter to the Editor concerning "Revisiting the Schatzker classification of tibial plateau fractures" by Kfuri M, Schatzker J. *Injury*. 2018 49 December (12):2252-2263, *Injury* (2019) <https://doi.org/10.1016/j.injury.2019.01.020>. *Injury*, 50(6), 1262-1264. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2019.04.010>
- [15] Czaja, A. J. (2016). Diagnosis and Management of Autoimmune Hepatitis: Current Status and Future Directions. *Gut and liver*, 10(2), 177-203. <https://doi.org/10.5009/gnl15352>
- [16] Stravitz, R. T., Lefkowitz, J. H., Fontana, R. J., Gershwin, M. E., Leung, P. S., Sterling, R. K., Manns, M. P., Norman, G. L., Lee, W. M., & Acute Liver Failure Study Group (2011). Autoimmune acute liver failure: proposed clinical and histological criteria. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 53(2), 517-526. <https://doi.org/10.1002/hep.24080>
- [17] Balitzer, D., Shafizadeh, N., Peters, M. G., Ferrell, L. D., Alshak, N., & Kakar, S. (2017). Autoimmune hepatitis: review of histologic features included in the simplified criteria proposed by the international autoimmune hepatitis group and proposal for new histologic criteria. *Modern pathology*, 30(5), 773-783. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.267>
- [18] Terziroli Beretta-Piccoli, B., Mieli-Vergani, G., & Vergani, D. (2017). Autoimmune hepatitis: Standard treatment and systematic review of alternative treatments. *World journal of gastroenterology*, 23(33), 6030-6048. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i33.6030>
- [19] Gatselis, N. K., Zachou, K., Koukoulis, G. K., & Dalekos, G. N. (2015). Autoimmune hepatitis, one disease with many faces: etiopathogenetic, clinico-laboratory and histological characteristics. *World journal of gastroenterology*, 21(1), 60-83. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i1.60>
- [20] Muratori, P., Lalanne, C., Fabbri, A., Cassani, F., Lenzi, M., & Muratori, L. (2015). Type 1 and type 2 autoimmune hepatitis in adults share the same clinical phenotype. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 41(12), 1281-1287. <https://doi.org/10.1111/apt.13210>
- [21] Czaja, A. J. (2011). Performance parameters of the conventional serological markers for autoimmune hepatitis. *Digestive diseases and sciences*, 56(2), 545-554. <https://doi.org/10.1007/s10620-010-1501-1>
- [22] Efe, C., Ozaslan, E., Wahlin, S., Purnak, T., Muratori, L., Quarneri, C., Yüksel, O., & Muratori, P. (2013). Antibodies to soluble liver antigen in patients with various liver diseases: a multicentre study. *Liver international*, 33(2), 190-196. <https://doi.org/10.1111/liv.12022>
- [23] Czaja, A. J. (2010). Autoantibodies as prognostic markers in autoimmune liver disease. *Digestive diseases and sciences*, 55(8), 2144-2161. <https://doi.org/10.1007/s10620-010-1268-4>
- [24] Gregorio, G. V., McFarlane, B., Bracken, P., Vergani, D., & Mieli-Vergani, G. (2002). Organ and non-organ specific autoantibody titres and IgG levels as markers of disease activity: a longitudinal study in childhood autoimmune liver disease. *Autoimmunity*, 35(8), 515-519. <https://doi.org/10.1080/0891693021000056721>
- [25] Zachou, K., Oikonomou, K., Renaudineau, Y., Chauveau, A., Gatselis, N., Youinou, P., & Dalekos, G. N. (2012). Anti- α actinin antibodies as new predictors of response to treatment in autoimmune hepatitis type 1. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 35(1), 116-125. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04908.x>
- [26] Mieli-Vergani, G., Vergani, D., Baumann, U., Czubkowski, P., Debray, D., Dezsöfi, A., Fischler, B., Gupte, G., Hierro, L., Indolfi, G., Jahnel, J., Smets, F., Verkade, H. J., & Hadžić, N. (2018). Diagnosis and Management of Pediatric Autoimmune Liver Disease: ESPGHAN Hepatology Committee Position Statement. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 66(2), 345-360. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001801>
- [27] Kirstein, M. M., Metzler, F., Geiger, E., Heinrich, E., Hallensleben, M., Manns, M. P., & Vogel, A. (2015). Prediction of short- and long-term outcome in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 62(5), 1524-1535. <https://doi.org/10.1002/hep.27983>