



# 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

S. O. Fedotov<sup>ID</sup>A-D, A. S. Hotsulia<sup>ID</sup>\*A,C,E,F

Zaporizhzhia State Medical 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

The combination of pyrazole and 1,2,4-triazole fragments in one structure makes it possible to achieve some success in creating potential biologically active compounds. Various factors contribute to this process. Among them, we can note the significant possibilities of chemical transformation involving these cycles, the simplicity, and reliability of methods, the creation of molecules with a certain level of bioavailability and the ability to influence a number of biochemical processes. Taking into account the presented facts, the creation of new compounds in a number of pyrazolo-triazole condensed systems is scientifically attractive with endowed features of practical significance and relevance.

**The aim of the work** was to identify optimal conditions for the production of 3-(ethylthio)-9-methyl-6-(alkylthio)pyrazolo[1,5-d][1,2,4]triazolo[3,4-f][1,2,4]triazines and to study the properties of the target reaction products.

**Materials and methods.** The chemical part of the work involved the step-by-step creation of target reaction products in the form of 3-(ethylthio)-9-methyl-6-(alkylthio)pyrazolo[1,5-d][1,2,4]triazolo[3,4-f][1,2,4]triazines. The first stage was aimed at conducting the interaction of diethylxalate with acetone with the participation of sodium methylate in a methanol medium. Ethyl-2,4-dioxopentanoate was used in the conversion process to 3-methylpyrazole-5-carbohydrazide with the participation of hydrazine hydrate. Further modification of the molecule consisted of the gradual formation of the structure of 4-amino-5-(3-methylpyrazol-5-yl)-1,2,4-triazole-3-thiol. The next step involved the synthesis of 3-ethylthio-5-(3-methylpyrazol-5-yl)-1,2,4-triazole-4-amine. Further conversion included the production of potassium 3-ethylthio-9-methylpyrazolo[1,5-d][1,2,4]triazolo[3,4-f][1,2,4]triazine-6-thiolate and its S-alkyl derivatives along the triazine fragment. Cyclooxygenase-2, lanosterol-14 $\alpha$ -demethylase and receptor tyrosine kinase were selected as model enzymes for docking, the crystal structure of which was loaded from the Protein Data Bank.

**Results.** The synthesis of 3-(ethylthio)-9-methyl-6-(alkylthio)-pyrazolo[1,5-d][1,2,4]triazolo[3,4-f][1,2,4]triazines were carried out and the optimal conditions for the production of these substances were determined. The structure of the chemical transformation products was proved and the results of the study of the main physical properties were recorded. The results of virtual studies provided an opportunity to substantiate the prospects of the selected chemical transformation vector, which ultimately made it possible to determine the biological potential of the obtained compounds.

**Conclusions.** Based on the results of the study, information was obtained that gives a certain idea of the possible level of influence of synthesized compounds on the activity of lanosterol-14 $\alpha$ -demethylase, which makes it advisable to further search for substances with fungistatic and fungicidal effects.

**Key words:** 1,2,4-triazole, pyrazole, physico-chemical properties, molecular docking.

**Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 227–234**

## Синтез та властивості 3-(етилтіо)-9-метил-6-(алкілтіо)піразоло[1,5-d][1,2,4]тріазоло-3,4-f[1,2,4]тріазинів

С. О. Федотов, А. С. Гоцуля

Поєднання в одній структурі фрагментів піразолу та 1,2,4-тріазолу дає змогу досягти певних успіхів у сфері створення потенційних біологічно активних сполук. Цьому процесу сприяють різні фактори, як-от суттєві можливості хімічного перетворення за участю названих циклів, простота та надійність методик, створення молекул із певним рівнем біодоступності та змогою впливати на низку біохімічних процесів. Отже, створення нових сполук у ряду піразоло-тріазолових конденсованих систем викликає науковий інтерес, має практичне значення та характеризується актуальністю.

**Мета роботи** – визначення оптимальних умов отримання 3-(етилтіо)-9-метил-6-(алкілтіо)піразоло[1,5-d][1,2,4]тріазоло[3,4-f][1,2,4]тріазинів і дослідити властивості цільових продуктів реакції.

**Матеріали та методи.** Хімічна частина роботи передбачала поетапне створення цільових продуктів реакції – 3-(етилтіо)-9-метил-6-(алкілтіо)піразоло[1,5-d][1,2,4]тріазоло[3,4-f][1,2,4]тріазинів. Перший етап мав на меті проведення взаємодії діетилхалату з

### ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/263994>

UDC 547.792:768:532.024.03/04.057

DOI: [10.14739/2409-2932.2022.3.263994](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2022.3.263994)

**Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 227–234**

**Key words:** 1,2,4-triazole, pyrazole, physico-chemical properties, molecular docking.

\*E-mail: [andrey.goculya@gmail.com](mailto:andrey.goculya@gmail.com)

Received: 04.08.2022 // Revised: 31.08.2022 // Accepted: 06.09.2022

ацетоном за участю натрій метилату в середовищі метанолу. Одержаний етил-2,4-діоксопентаноат на наступному етапі застосували у процесі перетворення у 3-метилпіразол-5-карбогідразид за участю гідразин гідрату. Надалі модифікація молекули полягала в поетапному формуванні структури 4-аміно-5-(3-метилпіразол-5-іл)-1,2,4-тріазол-3-тіолу. Наступний крок передбачав синтез 3-етилтіо-5-(3-метилпіразол-5-іл)-1,2,4-тріазол-4-аміну. Далі перетворення – одержання калій 3-етилтіо-9-метилпіразоло[1,5-*d*][1,2,4]тріазоло[3,4-*f*][1,2,4]тріазино-6-тіолату та його *S*-алкілпохідних за тріазиновим фрагментом. Як модельні ферменти для докінгу обрали циклооксигеназу-2, ланостерол-14 $\alpha$ -деметилазу та рецепторну тирозинкіназу, кристалічну структуру яких завантажили з Protein Data Bank.

**Результати.** Здійснили синтез 3-(етилтіо)-9-метил-6-(алкілтіо)-піразоло[1,5-*d*][1,2,4]тріазоло[3,4-*f*][1,2,4]тріазинів, визначили оптимальні умови процесу одержання цих речовин. Довели структуру продуктів хімічного перетворення, зафіксували результати дослідження основних фізичних властивостей. Результати віртуальних досліджень обґрунтували перспективність обраного вектора хімічної трансформації, а отже дали змогу визначитися з біологічним потенціалом одержаних сполук.

**Висновки.** У результаті дослідження отримали інформацію, що формує уявлення про можливий рівень впливу синтезованих сполук на активність ланостерол-14 $\alpha$ -деметилази, а отже доцільним є продовження пошуку речовин із фунгістатичною та фунгіцидною діями.

**Ключові слова:** 1,2,4-тріазол, піразол, фізико-хімічні властивості, молекулярний докінг.

**Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики.** 2022. Т. 15, № 3(40). С. 227–234

Heterocyclic compounds are an inexhaustible source for obtaining promising biologically active molecules [1–5]. Therefore, the synthesis of new condensed systems with the participation of heterocycles has favorable conditions for active development, because it allows you to create molecules with different types of biological activity [6]. Among such systems, special attention is focused on those that contain Nitrogen in their structure.

Among a significant number of azaheterocyclic systems, pyrazole and 1,2,4-triazole are distinguished in a certain way. The use of heterocycles in the process of creating new “drug-like” molecules is justified by the results of numerous studies in the field of prototyping innovative medicines. The formation of this phenomenon is explained by numerous factors. These are the characteristic features of the structure and significant possibilities of various chemical modifications, as well as the ability to form structures with hydrophilic properties. These principles and guidelines for targeted synthesis allowed a significant circle of scientists to obtain certain practically significant results for pharmacy and medicine [7–13]. But, despite the achievement of significant results, there is still a certain list of issues in the segment of creating condensed systems based on pyrazole and 1,2,4-triazole and studying their properties that require solving and comprehensive research.

## Aim

The aim of the work was to identify optimal conditions for the production of 3-(ethylthio)-9-methyl-6-(alkylthio)pyrazolo[1,5-*d*][1,2,4]triazolo[3,4-*f*][1,2,4]triazines and to study the properties of the target reaction products.

## Materials and methods

The chemical stage of the scientific work involved the process of its implementation and creation of target products of chemical transformation using classical methods of organic synthesis. Well-known reagents and common solvents were used (Fig. 1). Synthetic studies were carried out using reagents of the companies “Merck KGaA” (Germany), “Sigma-Aldrich

Chemicals Ltd” (USA) with chemical qualification *purum* or *pro analysis*.

**Potassium 3-(ethylthio)-9-methylpyrazolo[1,5-*d*][1,2,4]triazolo[3,4-*f*][1,2,4]triazine-6-thiolate (3).** 0.01 Mol of 3-(ethylthio)-5-(3-methylpyrazol-5-yl)-1,2,4-triazole-4-amine was added to a solution of 0.01 mol of potassium hydroxide in 50 ml of propane-2-ol and stirred until dissolved. After complete dissolution, the mixture was placed in an ice bath and carbon disulfide was added drop by drop. This solution was stirred for 2 hours. Excess alcohol was removed under a vacuum. The resulting yellow crystalline substance was filtered and recrystallized from alcohol.

**General procedure for the synthesis of 3-(ethylthio)-9-methyl-6-(alkylthio)-pyrazolo[1,5-*d*][1,2,4]triazolo[3,4-*f*][1,2,4]triazines (3.1–3.10).** An equivalent amount of the corresponding haloalkane (C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>Br; n = 1–10) was added to a solution of 0.005 mol of potassium 3-(ethylthio)-9-methylpyrazolo[1,5-*d*][1,2,4]triazolo[3,4-*f*][1,2,4]triazine-6-thiolate in 35 ml of propane-2-ol obtained by heating. The solution then was heated for 1 hour. Excess alcohol was removed under vacuum. The resulting sediment was filtered and recrystallized.

The structure and individuality of the synthesized substances were confirmed by modern methods of analysis. Melting points were determined using open capillaries using the Stanford Research Systems Melting point Apparatus 100 (SRS, USA). Element analysis (C, H, N, S) was performed using an “Elementar vario EL cube” analyzer (Elementary Analysensysteme, Germany) with quantitative determination of components by thermal conductivity on the detector. <sup>1</sup>H NMR spectra (400 MHz) were obtained on a “Varian-Mercury 400” spectrometer (Bruker DRX 500, USA) in DMSO-*d*<sub>6</sub> medium using tetramethylsilane as an internal standard. Chromato-mass spectra were recorded on an “Agilent 1260 Infinity HPLC” liquid chromatograph system (Agilent, Germany) with an “Agilent 6120” spectrometer (Agilent, Germany) (electrospray ionization method (ESI)).

Research *in silico* was a molecular docking method using “Vina” and “Discovery Studio” as software. This method allowed you to navigate the selection of molecules with a certain level of affinity for a certain biological target. Mac-

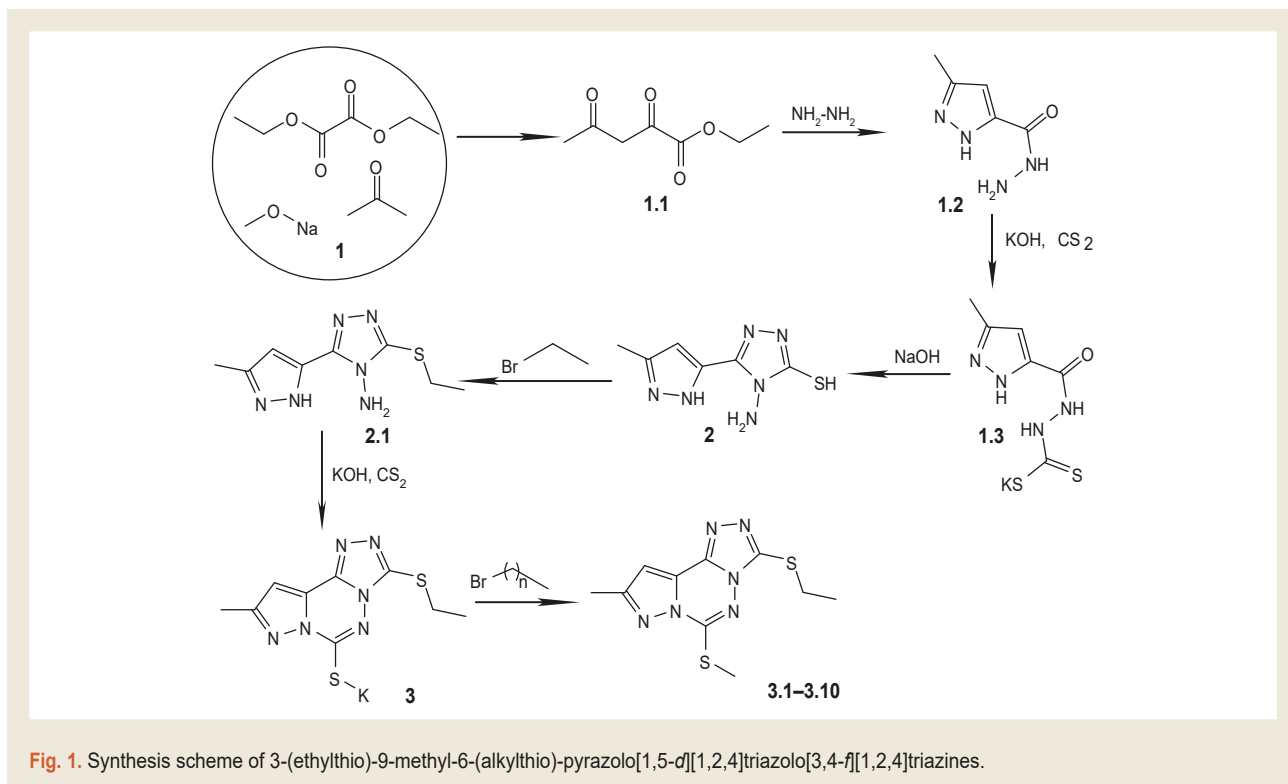


Fig. 1. Synthesis scheme of 3-(ethylthio)-9-methyl-6-(alkylthio)-pyrazolo[1,5-*d*][1,2,4]triazolo[3,4-*f*][1,2,4]triazines.

romolecules from the Protein Data Bank (PDB) were used as biological targets, namely: a fragment of cyclooxygenase-2 in complex with celecoxib, lanosterol-14 $\alpha$ -dimethylase in complex with fluconazole, and receptor tyrosine kinase in complex with crizotinib.

The choice of biological targets is determined by the literature data on the mechanism of action of antifungal agents.

The research methodology consisted of the following stages:

1) ligand preparation: construction of structural formulas of compounds using the program “MarvinSketch 6.3.0” (saving in mol-format); creation of a 3D structure of formulas of compounds-molecular modeling using the program “Hyper Chem 8” based on the method of molecular mechanics MM+ and semi-empirical quantum mechanical method PM3 with the maximum number of cycles and Polak–Ribiere algorithm (saving in pdb-format); application of “AutoDockTools-1.5.6” to convert pdb files to PDBQT;

2) enzyme preparation: removing water and ligand molecules from the crystal using the “Discovery Studio 4.0” software package (saving in pdb format); adding polar Hydrogen atoms and converting the enzyme from the pdb file to PDBQT using “AutoDockTools-1.5.6”;

3) molecular docking: performing docking using the “Vina” program; data visualization was performed using the “Discovery Studio 4.0” program.

## Results

The stepwise formation of the structure of the Intermediate 3-ethylthio-5-(3-methylpyrazol-5-yl)-1,2,4-triazole-4-amine and the properties of all preintermediates were described in

previous works [14,15]. The synthesis of potassium 3-(ethylthio)-9-methylpyrazolo[1,5-*d*][1,2,4]triazolo[3,4-*f*][1,2,4]triazine-6-thiolate was successfully performed using carbon disulfide in an alkaline alcohol medium (Fig. 1).

As part of solving one of the problems that were set in this paper, alkylation for Sulfur was performed on a triazine fragment of compound 3. For this purpose, bromoalkanes were used as an alkylating agent. The reaction was carried out in a propane-2-ol medium when heated for 1 hour.

The synthesized substances are white crystalline powders, soluble in DMFA and DMSO, when heated – in 1,4-dioxane, practically insoluble in water, diethyl ether, and chloroform.

The structure of all synthesized substances was confirmed by physical-chemical methods: <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and elemental analysis. The purity of the chemical interaction products and their identity were confirmed by chromat-mass spectra.

**3.1:** <sup>1</sup>H NMR,  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz): 7.35 (s, CH, pyrazole), 3.22 (q,  $J = 6.2$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.61 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>), 2.54 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.37 (t,  $J = 12.5$  Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). Anal. calcd. (%) for C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>6</sub>S<sub>2</sub> ESI-MS:  $m/z = 281$  [M+H]<sup>+</sup>. Elemental Analysis: C, 42.84; H, 4.31; N, 29.98; S, 22.87. Found: C, 42.95; H, 4.32; N, 29.90; S, 22.81.

**3.2:** <sup>1</sup>H NMR,  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz): 7.36 (s, CH, pyrazole), 3.22 (q,  $J = 6.2$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.13 (q,  $J = 5.5$  Hz, 2H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.54 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.38–1.31 (m, 6H, 2CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). Anal. calcd. (%) for C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>6</sub>S<sub>2</sub> ESI-MS:  $m/z = 295$  [M+H]<sup>+</sup>. Elemental Analysis: C, 44.88; H, 4.79; N, 28.55; S, 21.78. Found: C, 44.76; H, 4.78; N, 28.48; S, 21.84.

**3.3:** <sup>1</sup>H NMR,  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz): 7.35 (s, CH, pyrazole), 3.22 (q,  $J = 6.2$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.14 (t,  $J = 4.6$  Hz, 2H,

SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.54 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.77 – 1.71 (m, 2H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.37 (t, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.07 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). Anal. calcd. (%) for C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>S<sub>2</sub> ESI-MS: *m/z* = 309 [M+H]<sup>+</sup>. Elemental Analysis: C, 46.73; H, 5.23; N, 27.25; S, 20.79. Found: C, 46.86; H, 5.24; N, 27.17; S, 20.73.

**3.4:** <sup>1</sup>H NMR,  $\delta$  (ppm), *J* (Hz): 7.37 (s, CH, pyrazole), 3.12 (t, *J* = 4.6 Hz, 2H, SCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.21 (q, *J* = 5.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.54 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.69 – 1.61 (m, 2H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.39 – 1.33 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.92 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, S(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>). Anal. calcd. (%) for C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>S<sub>2</sub> ESI-MS: *m/z* = 323 [M+H]<sup>+</sup>. Elemental Analysis: C, 48.42; H, 5.63; N, 26.06; S, 19.89. Found: C, 48.29; H, 5.62; N, 26.13; S, 19.94.

**3.5:** <sup>1</sup>H NMR,  $\delta$  (ppm), *J* (Hz): 7.36 (s, CH, pyrazole), 3.27 – 3.18 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, SCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>), 2.54 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.78 – 1.70 (m, 2H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.41 – 1.33 (m, 7H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.89 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, S(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>). Anal. calcd. (%) for C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>S<sub>2</sub> ESI-MS: *m/z* = 337 [M+H]<sup>+</sup>. Elemental Analysis: C, 49.98; H, 5.99; N, 24.98; S, 19.06. Found: C, 49.83; H, 6.00; N, 25.05; S, 19.01.

**3.6:** <sup>1</sup>H NMR,  $\delta$  (ppm), *J* (Hz): 7.36 (s, CH, pyrazole), 3.26 – 3.17 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, SCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 2.54 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.65 – 1.57 (m, 2H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>), 1.42 – 1.32 (m, 9H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>), 0.94 – 0.84 (m, 3H, S(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>). Anal. calcd. (%) for C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>S<sub>2</sub> ESI-MS: *m/z* = 351 [M+H]<sup>+</sup>. Elemental Analysis: C, 51.40; H, 6.33; N, 23.98; S, 18.29. Found: C, 51.53; H, 6.34; N, 23.92; S, 18.24.

**3.7:** <sup>1</sup>H NMR,  $\delta$  (ppm), *J* (Hz): 7.35 (s, CH, pyrazole), 3.27 – 3.20 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, SCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>), 2.55 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.65 – 1.57 (m, 2H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 1.37 – 1.25 (m, 11H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 0.92 – 0.86 (m, 3H, S(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>). Anal. calcd. (%) for C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>S<sub>2</sub> ESI-MS: *m/z* = 365 [M+H]<sup>+</sup>. Elemental Analysis: C, 52.72; H, 6.64; N, 23.05; S, 17.59. Found: C, 52.57; H, 6.63; N, 22.99; S, 17.64.

**3.8:** <sup>1</sup>H NMR,  $\delta$  (ppm), *J* (Hz): 7.37 (s, CH, pyrazole), 3.27 – 3.19 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, SCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>), 2.55 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.65 – 1.57 (m, 2H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>), 1.39 – 1.28 (m, 13H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>), 0.94 – 0.85 (m, 3H, S(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>). Anal. calcd. (%) for C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>S<sub>2</sub> ESI-MS: *m/z* = 379 [M+H]<sup>+</sup>. Elemental Analysis: C, 53.94; H, 6.92; N, 22.20; S, 16.94. Found: C, 54.09; H, 6.91; N, 22.14; S, 16.99.

**3.9:** <sup>1</sup>H NMR,  $\delta$  (ppm), *J* (Hz): 7.37 (s, CH, pyrazole), 3.28 – 3.20 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, SCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>), 2.54 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.65 – 1.57 (m, 2H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>), 1.40 – 1.33 (m, 15H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>), 0.94 – 0.85 (m, 3H, S(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>CH<sub>3</sub>). Anal. calcd. (%) for C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>S<sub>2</sub> ESI-MS: *m/z* = 393 [M+H]<sup>+</sup>. Elemental Analysis: C, 55.07; H, 7.19; N, 21.41; S, 16.33. Found: C, 54.93; H, 7.18; N, 21.46; S, 16.37.

**3.10:** <sup>1</sup>H NMR,  $\delta$  (ppm), *J* (Hz): 7.36 (s, CH, pyrazole), 3.27 – 3.18 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, SCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>), 2.56 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.63 – 1.57 (m, 2H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>), 1.40 – 1.27 (m, 17H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>), 0.94 – 0.85 (m, 3H, S(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>CH<sub>3</sub>). ESI-MS: *m/z* = 407 [M+H]<sup>+</sup>. Analytical calculated (%) for C<sub>19</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>S<sub>2</sub>: C, 56.12; H, 7.44; N, 20.67; S, 15.77. Found: C, 56.27; H, 7.45; N, 20.61; S, 15.73.

Methods for creating innovative drugs (“drug-design”) include molecular docking, molecular modeling, and molecular dynamics to elucidate the activity of promising molecules, establish biological targets for ligand binding, and rationally create potential drug substance candidates.

It should be noted that the synthesized structures have some similarities with the corresponding drugs, which exhibit anti-inflammatory (celecoxib), antifungal (fluconazole), and anti-cancer (crizotinib) activity. At the same time, these drugs have a wide range of side effects. Therefore, the creation of new medicines with such types of activities is relevant.

Complexes of synthesized compounds with cyclooxygenase-2, lanosterol-14 $\alpha$ -demethylase, and receptor tyrosine kinase were analyzed by the ligand-receptor binding energy and evaluated visually [16–18].

Analysis of the results of docking studies demonstrates a wide range of amino acid residues of the active site of cyclooxygenase-2, which can take part in the formation of bonds with synthesized ligands (Table 1).

The completeness of the idea of the possibility of interaction of synthesized structures with the active COX-2 center was supplemented by quantitative indicators (Table 2).

Among antifungal drugs, a significant percentage are built on the basis of various heterocyclic fragments. Among such fragments, nitrogen-containing compounds occupy an important place. This interaction leads to a violation of the functions of lanosterol-14 $\alpha$ -demethylase, which leads to blocking the synthesis of ergosterol, which is an important structural component of the fungal cell membrane and ensures the implementation of its important functions.

The nature of amino acid fragments of lanosterol-14 $\alpha$ -demethylase, which were probably responsible for interaction with synthesized ligands, has been established (Table 3).

The obtained energy indicators of intermolecular interactions confirm a significant probability of detecting antifungal properties in a number of synthesized compounds (Table 4).

The obtained compounds were also docked relative to the receptor tyrosine kinase, which made it possible to establish the nature of the actual amino acid fragments (Table 5).

The obtained energy values of intermolecular interactions indicate a diverse level of probability of detecting compounds with the ability to actively influence the activity of receptor tyrosine kinase (Table 6).

## Discussion

<sup>1</sup>H NMR spectra of all synthesized compounds were characterized by the presence of singlet signals due to the Hydrogen of the pyrazole fragment (7.37–7.35 ppm) and the methyl group associated with this heterocycle (2.56–2.54 ppm). The signal intensity in this case corresponds to 1 and 3 protons, respectively. The spectra of the obtained compounds also contain thioethyl substitute signals in the form of a two-proton quadruplet (3.22 ppm) and a three-proton triplet (1.37 ppm). But in most cases, the signals of this fragment resonate together with the protons of methylene groups of

**Table 1.** Amino acid residues of the active COX-2 center involved in interaction with the studied compounds

No.	Nature of the amino acid residue
3.1	ALAA: 517, ALAA: 528, HIS A: 90, LEU A: 353, LEU A: 532, PHE A: 519, SERA: 354, TRP A: 388, TYR A: 386, VAL A: 350, VAL A: 524
3.2	ALAA: 517, ALAA: 528, HIS A: 90, LEU A: 385, LEU A: 532, PHE A: 519, SERA: 354, TRP A: 388, TYR A: 386, VAL A: 350, VAL A: 524
3.3	ALAA: 517, ALAA: 528, ARG A: 514, HIS A: 90, LEU A: 353, LEU A: 532, PHE A: 519, SERA: 354, TYR A: 356, VAL A: 117, VAL A: 350, VAL A: 524
3.4	ALAA: 517, ALAA: 528, ARG A: 514, LEU A: 353, LEU A: 532, PHE A: 519, SERA: 354, TYR A: 356, VAL A: 117, VAL A: 350, VAL A: 524
3.5	ALAA: 517, ALAA: 528, ARG A: 514, LEU A: 353, LEU A: 532, PHE A: 519, SERA: 354, TYR A: 356, VAL A: 117, VAL A: 350, VAL A: 524
3.6	ALAA: 528, ARG A: 121, ILE A: 113, LEU A: 93, LEU A: 353, PRO A: 529, TRP A: 100, TYR A: 116, TYR A: 349, TYR A: 356, VAL A: 89, VAL A: 117, VAL A: 350
3.7	ALAA: 528, ARG A: 121, ILE A: 113, LEU A: 93, LEU A: 353, PRO A: 529, TRP A: 100, TYR A: 116, TYR A: 349, TYR A: 356, TYR A: 386, VAL A: 89, VAL A: 117, VAL A: 350
3.8	ALAA: 528, ARG A: 121, ILE A: 113, LEU A: 93, LEU A: 353, PRO A: 529, TRP A: 100, TRP A: 388, TYR A: 116, TYR A: 349, TYR A: 356, TYR A: 386, VAL A: 350
3.9	ALAA: 528, HIS A: 90, ILE A: 113, LEU A: 93, LEU A: 353, LEU A: 535, PHE A: 206, TYR A: 116, TYR A: 349, TYR A: 356, VAL A: 117, VAL A: 345, VAL A: 350, VAL A: 524
3.10	ALAA: 528, ILE A: 113, LEU A: 93, LEU A: 353, LEU A: 535, PHE A: 206, SERA: 531, TYR A: 116, TYR A: 349, TYR A: 356, VAL A: 117, VAL A: 345, VAL A: 350, VAL A: 524

**Table 2.** Energy value of intermolecular interactions of the studied compounds with cyclooxygenase-2

No.	$E_{min}$	N	$E_{min}$	N	$E_{min}$
3.1	-6.9	3.4	-4.9	3.8	-3.8
3.2	-6.4	3.5	-5.0	3.9	-4.3
3.3	-5.8	3.6	-3.9	3.10	-4.7
Celecoxib	-13.4	3.7	-3.7		

$E_{min}$ : minimum complexation energy, kcal/mol.

**Table 3.** Amino acid residues of the active lanosterol-14 $\alpha$ -demethylase center, which are involved in interaction with the studied compounds

No.	Nature of the amino acid residue
3.1	ALA A: 256, ALA A: 400, CYS A: 394, GLY A: 396, LEU A: 100, LEU A: 152, PHE A: 387, PRO A: 320, VAL A: 395
3.2	ALA A: 256, ALA A: 400, ARG A: 96, CYS A: 394, GLY A: 396, LEU A: 100, LEU A: 152, PHE A: 387, PRO A: 320, SERA: 261, VAL A: 395
3.3	ALA A: 256, CYS A: 394, LEU A: 100, LEU A: 321, LEU A: 324, LEU A: 315, PHE A: 387, PRO A: 320, PRO A: 349
3.4	ALA A: 256, ALA A: 400, CYS A: 394, LEU A: 315, LEU A: 321, LEU A: 324, PHE A: 83, PHE A: 387, PRO A: 320
3.5	ALA A: 256, ALA A: 400, CYS A: 394, ILE A: 404, LEU A: 315, LEU A: 324, PHE A: 387
3.6	ALA A: 400, CYS A: 394, ILE A: 404, LEU A: 311, LEU A: 315, LEU A: 321, LEU A: 324, PHE A: 83, PHE A: 387
3.7	ALA A: 400, CYS A: 394, ILE A: 404, LEU A: 311, LEU A: 315, LEU A: 321, LEU A: 324, PHE A: 83, PHE A: 387
3.8	ARG A: 96, HIS A: 392, ILE A: 323, LEU A: 321, MET A: 79, MET A: 433, PHE A: 78, PHE A: 83, TYR A: 76, VAL A: 395
3.9	ARG A: 96, HIS A: 392, ILE A: 323, LEU A: 321, MET A: 79, MET A: 433, PHE A: 78, TYR A: 76, VAL A: 395
3.10	ALA A: 400, CYS A: 394, LEU A: 321, LEU A: 324, MET A: 79, PHE A: 83, TYR A: 76

**Table 4.** Energy values of intermolecular interactions of the studied compounds with lanosterol-14 $\alpha$ -demethylase (3LD6)

No.	$E_{min}$	N	$E_{min}$	N	$E_{min}$
3.1	-7.2	3.4	-8.0	3.8	-7.9
3.2	-7.6	3.5	-8.1	3.9	-8.0
3.3	-7.7	3.6	-7.7	3.10	-5.4
Fluconazole	-8.4	3.7	-7.6		

$E_{min}$ : minimum complexation energy, kcal/mol.

**Table 5.** Amino acid residues of the active center of the receptor tyrosine kinase, which are involved in interaction with the studied compounds

No.	Nature of amino acid residue
3.1	ALA A: 1148, LEU A: 1122, LEU A: 1256, VALA: 1130
3.2	ALA A: 1148, LEU A: 1122, LEU A: 1256, VALA: 1130
3.3	ALA A: 1148, LEU A: 1122, LEU A: 1196, LEU A: 1256, VALA: 1130
3.4	ALA A: 1148, ARG A: 1253, LEU A: 1122, LEU A: 1256, VALA: 1130
3.5	ALA A: 1148, ALA A: 1200, LEU A: 1122, LEU A: 1196, LEU A: 1198, LEU A: 1256, VALA: 1130
3.6	LEU A: 1122, LEU A: 1196, LEU A: 1198, LEU A: 1256, LYS A: 1150, VALA: 1130
3.7	LEU A: 1122, LEU A: 1196, LEU A: 1198, LEU A: 1256, LYS A: 1150, VALA: 1130
3.8	ALA A: 1130, ALA A: 1148, LEU A: 1122, LEU A: 1196, LEU A: 1256, MET A: 1199, VALA: 1130
3.9	ALA A: 1200, ARG A: 1253, LEU A: 1122, LEU A: 1196, LEU A: 1198, LEU A: 1256, VALA: 1130
3.10	LEU A: 1122, LEU A: 1196, LEU A: 1256, VALA: 1130

**Table 6.** Energy value of intermolecular interactions of the studied compounds with receptor tyrosine kinase

No.	$E_{min}$	N	$E_{min}$	N	$E_{min}$
3.1	-5.6	3.4	-7.0	3.8	-5.9
3.2	-6.5	3.5	-7.4	3.9	-8.5
3.3	-5.8	3.6	-7.8	3.10	-5.9
Krizotonib	-10.8	3.7	-6.0		

$E_{min}$ : minimum complexation energy, kcal/mol.

another thioalkyl substitute, forming a complex multiproton multiplet (1.42–1.25 ppm).

In the  $^1\text{H}$  NMR spectra of compounds **3.3** and **3.4**, proton signals of the methylene fragment directly bound to sulfur in the triazine fragment are observed. The signal is formed in the form of a two-proton quadruplet and is fixed at 3.22–3.21 ppm in compounds **3.5–3.10**, this methylene fragment, together with the proton signals of a methylene fragment of another thioalkyl fragment, forms a multiplet at 3.28–3.17 ppm also in compounds **3.3–3.10**, the signals of the next methylene group of the thioalkyl substitute with a triazine fragment are recorded in a separate multiplet. It should be noted that an increase in the length of the thioalkyl fragment is accompanied by a gradual shift of the signal to a stronger-field section of the spectrum. So, in the spectrum of compound **3.3**, this multiplet is prescribed in the strong field region at 1.77–1.71 ppm, for compound **3.10** – at 1.63–1.57 ppm.

Protons of the methyl group, which is part of the thioalkyl substituent structure in the triazine fragment, form a signal in the form of a singlet (**3.1**), triplet (**3.3–3.5**) or multiplet (**3.2, 3.6–3.10**). These signals are recorded at 2.61 ppm (**3.1**), 1.38–1.31 ppm (**3.2**), 1.07–0.89 ppm (**3.3–3.5**) and 0.94–0.85 ppm (**3.6–3.10**), respectively.

The chromatographic spectra of the synthesized compounds contain a signal of the quasi-molecular ion  $[\text{M}+1]$ , which, according to the  $m/z$  value, corresponds to the molecular masses of the presented substances.

Visualization of the interaction of structures with the active site of cyclooxygenase-2 showed that they have a significant

spectrum of interactions with a significant number of amino acid residues.

For example, the hydrophobic alkyl interaction of compound **3.1** was realized with the participation of the thiomethyl fragment of the ligand and the amino acid residue TYR A: 386 and the thioethyl fragment of the specified ligand and the amino acid residues ALA A: 517 and HIS A: 90. Among the hydrophobic interactions, a  $\pi$ -alkyl can also be noted. This interaction was provided by a triazine fragment with residues ALA A: 528 and LEU A: 350. The amino acid residue ALA A: 528 also provided a  $\pi$ -alkyl interaction with the triazole fragment. Coordination at the active COX-2 site of compound **3.1** was also determined by the  $\pi$ -th interaction, which was realized with the participation of the VALA: 524 residue and the triazine fragment. Carbon-Hydrogen stacking with the participation of the SER A: 354 residue enhances the presented interaction.

Elongation of the alkyl fragment was accompanied by the formation of additional interactions, namely, intermolecular hydrogen bonds and Van der Waals forces appear. The first type of interaction occurred with the participation of the TYR A: 356 residue. Here, the hydrogen bond of the ligand was formed with the participation of electronegative atoms of the triazine fragment of nitrogen and the Sulfur of the thiopropyl substitute. The second type of interaction was formed with the participation of the SER A: 354 residue. It promoted the orientation of compound **3.3** at the active site and was enhanced by amide- $\pi$  stacking with the participation of the LEU A: 353 residue. These were alkyl,  $\pi$ -alkyl, and  $\pi$ -Sulphur interactions. The first type of interaction was re-

alized using residues ALA A: 528, LEU A: 532, VAL A: 117 (with a thiopropyl fragment). The second was using ALA A: 517, ARG A: 514, HIS A: 90 (with a thioethyl substitute). The third was realized with the participation of the PHE A: 519 residue in contact with thioethyl substituent sulfur.

Quantitative indicators of the minimum free binding energy of synthesized compounds to COX-2 were in the range of -3.8 ... -6.9 kcal/mol, which indicates a low probability of detecting substances with anti-inflammatory activity in a number of synthesized compounds (3.1–3.10) (Table 2).

The position of the obtained ligands in the active site of lanosterol-14 $\alpha$ -demethylase was provided by a number of known interactions, among which we can note: alkyl,  $\pi$ -alkyl,  $\pi$ - $\sigma$  and  $\pi$ -sulfur, as well as intermolecular hydrogen chemical bonds. For example, the alkyl interaction of compound 3.1 was realized with the participation of amino acid residues ALA A: 256, LEU A: 100, LEU A: 152, which were coordinated with the methyl group of the pyrazole fragment, VALA: 395 – with the methyl group of the thiomethyl substitute, ALA A: 400, PRO A: 320 – with the methyl group of the thioethyl substitute. The  $\pi$ -alkyl interaction of compound 3.1 was realized by alanine residues ALA A: 256 and ALA A: 400 in coordination with fragments of triazole and triazine, respectively. The  $\pi$ - $\sigma$ -interaction, which occurred with the participation of the GLY A: 396 residue and the triazine fragment, can also have a positive effect on the possible activity of this compound. Docking also demonstrated the formation of the  $\pi$ -Sulphur interaction, which for compound 3.1 was realized with the active participation of PHE A: 386 and the thioethyl substitute and with the participation of CYS A: 394 and the triazine fragment. An increase in the length of the alkyl residue was first accompanied by an increase in the number of intermolecular hydrogen chemical bonds (3.2) and then their disappearance. But sometimes this type of bond was formed again, for example, in compounds 3.5 and 3.10 (involving CYS A: 394 and the triazine fragment).

Taking into account the calculated values of the free binding energy for complexes formed by 3-(ethylthio)-9-methyl-6-(alkylthio)-pyrazolo[1,5-*d*][1,2,4]triazolo[3,4-*f*][1,2,4]triazines and lanosterol-14 $\alpha$ -demethylase receptors, it can be assumed that this hydrogen bond may be associated with the activity of compound 3.5 (Table 4). Compounds 3.4 and 3.9 can also be considered promising for further studies of antifungal activity (Table 4).

Analysis of docking with the active site of the receptor tyrosine kinase allows us to state a certain level of uniformity of interactions. These include alkyl,  $\pi$ -alkyl and  $\pi$ - $\sigma$  interactions. And only for compound 3.8, stabilization in the active center of this enzyme was additionally provided by an intermolecular hydrogen bond. This interaction was provided by the residue MET A: 1199. If we tell about other types of interactions that were defined for this compound, then we can note the alkyl interaction here. This type of coordination was due to the residues ALA A: 1148, LEU A: 1196, VAL A: 1130 (with a thioethyl substitute), LEU A: 1122 (with the methyl group of the pyrazole fragment). At the same time, VAL A: 1130 provided an alkyl type of

interaction with a thiooctile substitute. It was also necessary to mention the  $\pi$ -alkyl interaction provided by the residues ALA A: 1148, LEU A: 1122 (with a triazole fragment), LEU A: 1196, LEU A: 1122, VAL A: 1130 (with a triazine fragment). Changing the length of the carbon chain of a thioalkyl fragment was not possible it showed a significant effect on the nature and amount of amino acid residues in the active center of tyrosine kinase.

The minimum free binding energy of the synthesized compounds (3.1–3.10) to the receptor tyrosine kinase was in the range from -5.8 to -8.5 kcal/mol (Table 6). Compound 3.9 was the most promising for further research.

Thus, the obtained results of molecular docking allow us to justify the choice of haloalkanes for the design of target products of alkylation reactions in order to create promising biologically active molecules. In a number of synthesized compounds, the biological potential can vary significantly, which may be due to changes in the position of the ligand in the active center. This, in turn, affects the number of chemical bonds that form between the amino acid residues of the enzyme and the structure of the synthesized substance. After evaluating the possible effect on the activity of the three enzymes, it was necessary to pay attention to the length of the thioalkyl substitute combined with the triazine fragment. Thus, in the case of cyclooxygenase-2, the active ligand may be a compound with a short alkyl substitute, for example, methyl or ethyl. If it was lanosterol-14 $\alpha$ -demethylase or receptor tyrosine kinase, then alkyl substituents with the number of Carbon atoms from 5 to 9 contribute to the interaction with these enzymes.

## Conclusions

1. A simple construction of a poly heterocyclic structure was presented, which successfully combines fragments of pyrazole, 1,2,4-triazole, and 1,2,4-triazine and acts as the initial compound for obtaining a range of promising alkyl derivatives.
2. The conducted molecular docking made it possible to determine compounds with a high potential of antifungal activity in a number of synthesized substances.
3. The ability to influence the activity of the receptor tyrosine kinase 3-(ethylthio)-9-methyl-6-(nonyltio)-pyrazolo[1,5-*d*][1,2,4]-triazolo[3,4-*f*][1,2,4]triazine was demonstrated.

## Funding

The research was carried out as part of applied scientific and technical work "Development of techniques for analysis and study of 1,2,4-triazole derivatives as promising active pharmaceutical ingredients using high performance liquid chromatography", state registration No. 0120U101650.

**Conflicts of interest:** authors have no conflict of interest.  
**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 University, Ukraine.  
ORCID ID: [0000-0002-0421-5303](https://orcid.org/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 University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0001-9696-221X](https://orcid.org/0000-0001-9696-221X)

#### Відомості про авторів:

Федотов С. О., аспірант каф. природничих дисциплін для іноземних студентів та токсикологічної хімії, Запорізький державний медичний університет, Україна.

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

#### References

- [1] Boraie, A., Ghabbour, H. A., Gomaa, M. S., El Ashry, E., & Barakat, A. (2019). Synthesis and Anti-Proliferative Assessment of Triazolo-Thiadiazepine and Triazolo-Thiadiazine Scaffolds. *Molecules*, 24(24), 4471. <https://doi.org/10.3390/molecules24244471>
- [2] Othman, A. A., Kihel, M., & Amara, S. (2019). 1,3,4-Oxadiazole, 1,3,4-thiadiazole and 1,2,4-triazole derivatives as potential antibacterial agents. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 1660-1675. <https://doi.org/10.1016/j.arabjoc.2014.09.003>
- [3] Can, N. Ö., Acar Çevik, U., Sağlık, B. N., Levent, S., Korkut, B., Özkay, Y., & Kopalal, A. S. (2017). Synthesis, molecular docking studies, and antifungal activity evaluation of new benzimidazole-triazoles as potential lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase inhibitors. *Journal of Chemistry*, 2017, 9387102. <https://doi.org/10.1155/2017/9387102>
- [4] Shcherbyna, R., Panasenko, O., Polonets, O., Nedorezaniuk, N., & Duchenko, M. (2021). Synthesis, antimicrobial and antifungal activity of ylidenhydrazides of 2-((4-R-5-R,-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetaldehydes. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 45(3), 504-514. <https://doi.org/10.33483/jfpau.939418>
- [5] Yaroshenko, A. A., Parchenko, V. V., Bihdan, O. A., Panasenko, O. I., Karpenko, Y. V., & Karpun, E. O. Method for Trifuzol-neo assay determination by GC-MS. (2021). *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 14(9), 4523-4528. <https://doi.org/10.52711/0974-360X.2021.00787>
- [6] Sonawane, R., & Mohite, S. (2021). Heterocyclic bridgehead Nitrogen atom system: review on [1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazole and its pharmacological screening. *Asian journal of research in chemistry*, 14(3), 217-220. <https://doi.org/10.52711/0974-4150.2021.00038>
- [7] Safonov, A. (2020). Method of synthesis novel N'-substituted 2-((5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetohydrazides. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 44(2), 242-252. <https://doi.org/10.33483/jfpau.580011>
- [8] Frolova, Y., Kaplaushenko, A., & Nagornaya, N. (2020). Design, synthesis, antimicrobial and antifungal activities of new 1,2,4-triazole derivatives containing 1H-tetrazole moiety. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 44(1), 70-88. <https://doi.org/10.33483/jfpau.574001>
- [9] Samelyuk, Y. G., & Kaplaushenko, A. G. (2014). Synthesis of 3-alkylthio(sulfo)-1,2,4-triazoles, containing methoxyphenyl substituents at C<sup>5</sup>atoms, their antipyretic activity, propensity to adsorption and acute toxicity. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(5), 1117-1121.
- [10] Safonov, A., Nevmyvaka, A., Panasenko, O. & Knysh, Y. (2021). Microwave synthesis of 3- and 4-substituted-5-((3-phenylpropyl)thio)-4H-1,2,4-triazoles. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 45(3), 457-466. <https://doi.org/10.33483/jfpau.902274>.
- [11] Varynskiy, B., Kaplaushenko, A., & Parchenko, V. (2018). Electrospray ionization mass spectrometry fragmentation pathways of salts of some 1,2,4-triazolythioacetate acids, the active pharmaceutical ingredients. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11(10), 303-312. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i10.16564>
- [12] Gotsulya, A., Zaika, Y., & Brytanova, T. (2022). Synthesis, properties and biological potential some condensed derivatives 1,2,4-triazole. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 46(2), 308-321. <https://doi.org/10.33483/jfpau.971602>
- [13] Ismail, M. I., Mohamady, S., Samir, N., & Abouzid, K. A. M. (2020). Design, synthesis, and biological evaluation of novel 7H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazine inhibitors as antitumor agents. *ACS Omega*, 5, 20170-20176. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01829>
- [14] Gotsulya, A. S. (2020). Synthesis and antiradical activity of alkyl derivatives of 5-(5-methyl-1H-pyrazol-3-yl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole-3-thiol. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 44(2), 211-219. <https://doi.org/10.33483/jfpau.616116>
- [15] Fedotov, S. O., & Hotsulia, A. S. (2021). Synthesis and properties of S-derivatives of 4-amino-5-(5-methylpyrazol-3-yl)-1,2,4-triazole-3-thiol. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*, 14(3), 268-274. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2021.3.243176>
- [16] Biovia. (2019). *Discovery Studio Visualizer*, v 19.1.0.18287 [Software]. Retrieved from <http://www.3dsbiovia.com/>
- [17] ChemAxon. (2015). *MarvinSketch*, Version 6.3.0. [Software]. Retrieved from <http://www.chemaxon.com>
- [18] Worldwide Protein Data Bank. (n.d.). *Protein Data Bank (PDB)* [Database]. Retrieved from <http://www.pdb.org>





# Synthesis, antimicrobial and antifungal activity of 3-(2-bromophenyl)-5-(alkylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazoles

A. A. Safonov <sup>1</sup>, O. I. Panasenko <sup>1</sup>

Zaporizhzhia State Medical 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

To select a molecule that could become a promising pharmacological agent, chemists use already-known heterocyclic bases by adding pharmacologically active groups. One such heterocyclic system is 1,2,4-triazole base, on the basis of which a huge number of biologically active compounds have already been found. It is known that 1,2,4-triazole derivatives show a fairly high antimicrobial and antifungal effect while remaining low-toxic compounds and 5-alkylthio-1,2,4-triazoles exhibit antimicrobial and antifungal activity. Based on the literature search, it can be concluded that 3-(2-bromophenyl)-5-(alkylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazoles are insufficiently studied.

**The aim** of the work was to synthesize and investigate antimicrobial and antifungal activity among 3-(2-bromophenyl)-5-(alkylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazoles.

**Materials and methods.** It was used 5-(2-bromophenyl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole-3-thiol as a starting substance, which was synthesized by previously described techniques. 3-(2-Bromophenyl)-5-(alkylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazoles were obtained by alkylation of the starting thiol with haloalkanes (according to the first method) and the addition of hydrochloric acid in an alcoholic medium, then subsequent heating in microwave synthesis system (by the second method). To study the antimicrobial and antifungal activity of the newly synthesized 3-(2-bromophenyl)-5-(alkylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazoles, the method of serial dilutions was used according to guidelines.

**Results.** 3-(2-Bromophenyl)-5-(alkylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazoles were obtained by two methods: a) an equivalent amount of haloalkane was added to 5-(2-bromophenyl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole-3-thiol (I) (solvent – KOH pre-dissolved in 2-propanol). Boiled to pH = 7; b) 5-(2-bromophenyl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole-3-thiol (I) (solvent – methyl or 1-propyl alcohol and 10 drops of HCl) was heated in Milestone Flexi Wave microwave synthesis system. Reaction conditions: The mixture was heated for 45 minutes at a temperature of 150 °C, a pressure 14.4 bar, ΔMW ≈ 200 W. The completeness of the reaction was determined using a gas chromatograph Agilent 7890B with a mass spectrometric detector 5977B. Antimicrobial and antifungal activity of 3-(2-bromophenyl)-5-(alkylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazoles (6 new compounds) was investigated. The most active compound with antifungal and antimicrobial effect was II. Substances IIa–IIe had moderate antimicrobial effect.

**Conclusions.** New 3-(2-bromophenyl)-5-(alkylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazoles were synthesized by two methods. The antimicrobial and antifungal activity was investigated for the obtained compounds. The most active compound was 3-(2-bromophenyl)-5-(decylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole (II). Some conclusions were drawn regarding the dependence of “structure – antimicrobial and antifungal effect”: the antimicrobial effect increased with the length of the carbon radical; changing the decyl radical to another one in the molecule 3-(2-bromophenyl)-5-(alkylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole reduced antifungal activity.

**Key words:** organic synthesis, antimicrobial activity, antifungal activity, 1,2,4-triazole, heterocyclic compounds.

**Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 235–240**

## Синтез, протимікробна та протигрибкова активність 3-(2-бромфеніл)-5-(алкілтіо)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазолів

A. A. Сафонов, О. І. Панасенко

Для визначення молекули, що могла б стати перспективним фармакологічним агентом, хіміки використовують уже відомі гетероциклічні основи, додаючи до них фармакологічно активні групи. Одна з таких гетероциклічних систем – 1,2,4-тріазолова основа, на базі якої вже одержали величезну кількість біологічно активних сполук. Відомо, що похідні 1,2,4-тріазолу характеризуються доволі сильним протимікробним і протигрибковим ефектами, залишаючись при цьому малотоксичними сполуками. Є дані щодо протимікробної та протигрибкової активності 5-алкілтіо-1,2,4-тріазолів. Ґрунтуючись на результатах літературного пошуку, зробили висновок, що 3-(2-бромфеніл)-5-(алкілтіо)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазолі вивчено недостатньо.

**Мета роботи** – синтез і дослідження протимікробної та протигрибкової активності нових 3-(2-бромфеніл)-5-(алкілтіо)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазолів.

### ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/264691>

UDC 615.281/.282.015:547.792.057

DOI: [10.14739/2409-2932.2022.3.264691](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2022.3.264691)

**Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 235–240**

**Key words:** organic synthesis, antimicrobial activity, antifungal activity, 1,2,4-triazole, heterocyclic compounds.

\*E-mail: [8safonov@gmail.com](mailto:8safonov@gmail.com)

Received: 01.08.2022 // Revised: 25.08.2022 // Accepted: 30.08.2022

**Матеріали та методи.** Як вихідну речовину застосували 5-(2-бромфеніл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-тіол, який синтезували за попередньо наведеними методиками. 3-(2-Бромфеніл)-5-(алкілтіо)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазолі одержали шляхом алкілування вихідного тіолу галогеналканами (за першим методом) і додаванням хлороводневої кислоти в спиртовому середовищі з нагріванням надалі в системі мікрохвильового синтезу (за другим методом). Для вивчення протимікробної та протигрибкової активностей нових синтезованих 3-(2-бромфеніл)-5-(алкілтіо)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазолів використали метод серійних розведень згідно з рекомендаціями.

**Результати.** 3-(2-Бромфеніл)-5-(алкілтіо)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазолі отримували двома методами: а) еквівалентну кількість галогеналкану додавали до 5-(2-бромфеніл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-тіолу (I) (розчинник – 2-пропанол, у якому попередньо розчинений KOH); кип'ятили до pH = 7; б) 5-(2-бромфеніл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-тіол (I) (розчинник – метанол або 1-пропанол і 10 крапель HCl) нагрівали в системі мікрохвильового синтезу Milestone Flexi Wave; умови реакції: час – 45 хвилини, температура – 150 °C, тиск – 14,4 бар, ДМВ ≈ 200 Вт. Повноту реакції визначали за допомогою газового хроматографа Agilent 7890B з мас-спектрометричним детектором 5977B. Дослідили протимікробну та протигрибкову активності 3-(2-бромфеніл)-5-(алкілтіо)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазолів. Найактивніша сполука з протигрибковим і протимікробним ефектами – ІІІ. Речовини ІІа–ІІе мають помірну протимікробну дію.

**Висновки.** Нові 3-(2-бромфеніл)-5-(алкілтіо)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазолі синтезовано двома методами. Оцінювали протимікробну та протигрибкову активності одержаних сполук. Найактивніша – 3-(2-бромфеніл)-5-(децилтіо)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол (ІІІ). Сформулювали висновки щодо залежності «структура – протимікробна та протигрибкова дії»: зміна децильного радикала на пентильний у молекулі 3-(2-бромфеніл)-5-(алкілтіо)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазолу зменшує протигрибкову активність; антимікробний ефект посилюється зі збільшенням довжини вуглецевого радикала.

**Ключові слова:** органічний синтез, протимікробна активність, протигрибкова активність, 1,2,4-тріазол, гетероциклічні сполуки.

**Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2022. Т. 15, № 3(40). С. 235–240**

Along with the development of new diseases, the search for biologically active substances [1–3] with low toxicity, which in the future could become promising drugs is an urgent task for many scientists. A large number of people take part in the creation of a new drug. These are synthetic chemists, biologists, pharmacologists, and other scientists.

To select a molecule that could become a promising pharmacological agent, chemists use already-known heterocyclic bases by adding pharmacologically active groups [4,5]. One such heterocyclic system is 1,2,4-triazole base, on the basis of which a huge number of biologically active compounds have already been found [6].

It is known that 1,2,4-triazole derivatives show a fairly high antimicrobial and antifungal effect [7,8] while remaining low-toxic compounds [9] and 5-alkylthio-1,2,4-triazoles exhibit antimicrobial and antifungal activity [10].

Based on the literature search, it can be concluded that 3-(2-bromophenyl)-5-(alkylthio)-4-phenyl-4*H*-1,2,4-triazoles are insufficiently studied.

## Aim

That's why the aim of the work was to synthesize and investigate antimicrobial and antifungal activity among 3-(2-bromophenyl)-5-(alkylthio)-4-phenyl-4*H*-1,2,4-triazoles.

## Materials and methods

It was used 5-(2-bromophenyl)-4-phenyl-4*H*-1,2,4-triazole-3-thiol as a starting substance, which was synthesized by previously described techniques [11].

The chloride acid (35 %), iodomethane (99 %), 1-bromopropane (99 %), 1-bromobutane (99 %), 1-bromopentane (99 %), 1-bromohexane (99 %), 1-bromoheptane (99 %), 1-bromooctane (99 %), 1-bromononane (99 %), 1-bromodecane (99 %), 2-propanol (99,5 %), 1-propanol (anhydrous,

99,7 %) and methanol (99,5 %) were obtained from SIGMA-ALDRICH (Germany).

Milestone Flexi Wave microwave synthesis system (Italy) (technical specifications: rotor SK-15, minimum volume – 10 ml, maximum volume – 100 ml, maximum temperature – 300 °C, maximum working pressure – 100 bar, maximum shutter speed 220 °C – 30 min).

The methods presented in the State Pharmacopoeia of Ukraine (2.2.14) were used to study the physical and chemical properties of the synthesized compounds.

The automatic device to determine the melting point Opti-Melt Stanford Research Systems MPA100 (US production) was used to determine the melting temperature.

The elemental composition of the compounds is installed on the elemental analyzer Elementar Vario L cube (CHNS) (Analysensysteme GmbH, Germany) (standard is sulfanilamide).

The gas chromatograph Agilent 7890B with a 5977B mass spectrometry detector (US production) was used to control the completeness of the reactions and the individuality of new compounds.

<sup>1</sup>H NMR spectra were recorded on a spectrometer “Mercury 400” (Umatek International Inc.), as solvent DMSO-D<sub>6</sub> was used, internal standard – tetramethylsilane and deciphered using a computer program ADVASP 143.

To study the antimicrobial and antifungal activity of the newly synthesized 3-(2-bromophenyl)-5-(alkylthio)-4-phenyl-4*H*-1,2,4-triazoles, the method of serial dilutions was used according to guidelines [12]. The synthesized compounds were dissolved in dimethylsulfoxide.

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 885-653 were used as set of standard test strains. Comparison drugs Chlorhexidine-Zdorovyе® (Ukraine) and Fluconazole-Darnitsa® (Ukraine) were used to determine the activity values.

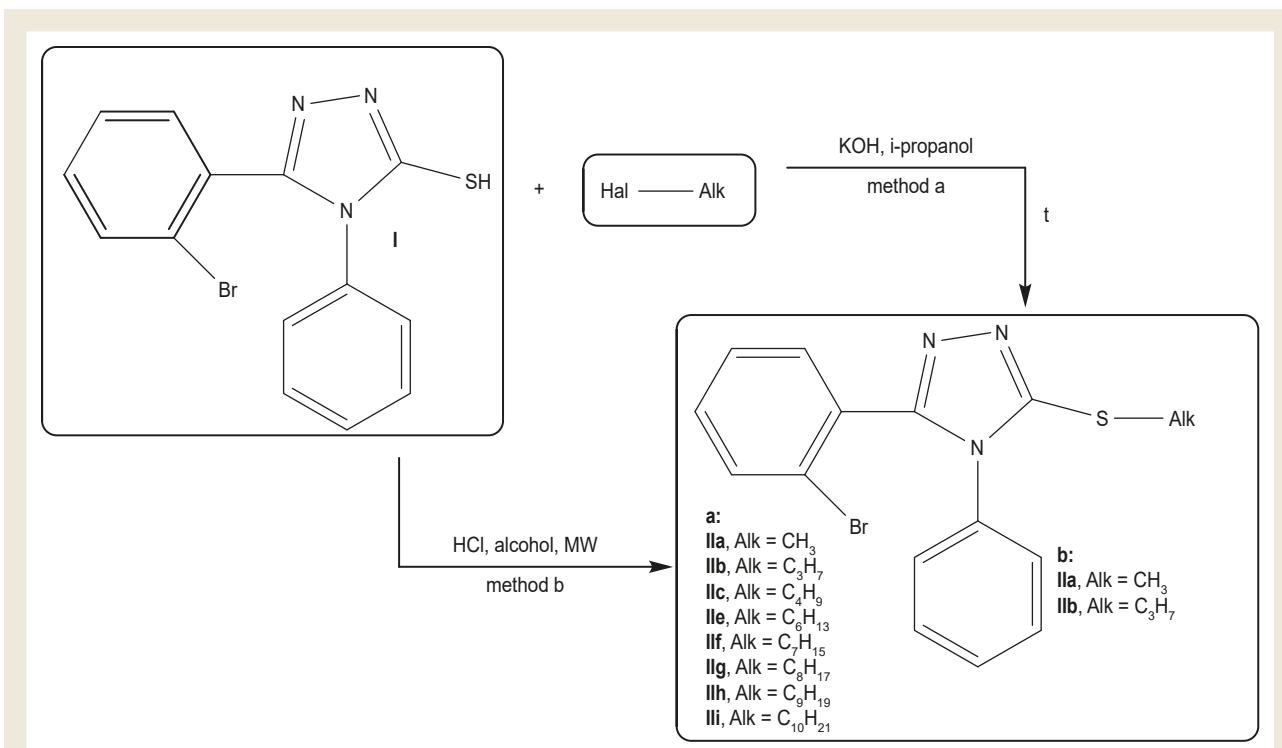


Fig. 1. Synthesis of 3-(2-bromophenyl)-5-(alkylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazoles.

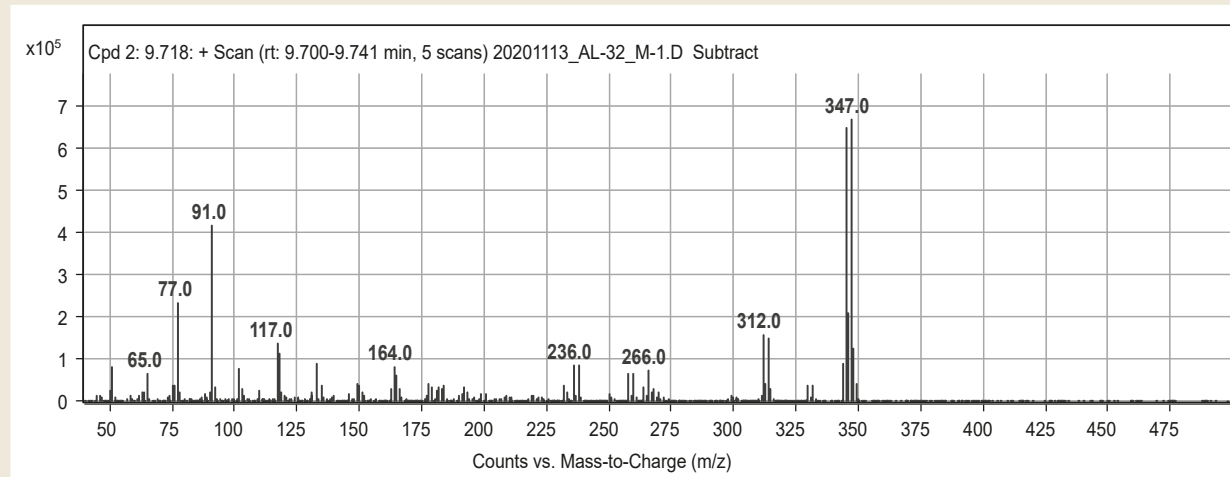


Fig. 2. Mass spectrum of 3-(2-bromophenyl)-5-(methylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole (IIa).

## Results

**Synthesis of 3-(2-bromophenyl)-5-(alkylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazoles.** 3-(2-bromophenyl)-5-(alkylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazoles were obtained by two methods:

a) In a round bottom flask equipped with a reflux condenser to 5-(2-bromophenyl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole-3-thiol (I) was added an equivalent amount of KOH pre-dissolved in 2-propanol, heated to dissolving the precipitate and adding an equivalent amount of halogenoalkane (iodomethane, 1-bromopropane, 1-bromobutane, 1-bromopentane, 1-bromohexane, 1-bromoheptane, 1-bromooctane, 1-bromononane, 1-bromodecane). Boiled to pH = 7. After cooling, a precipitate formed (Fig. 1);

b) In a Teflon vessel for microwave synthesis to 5-(2-bromophenyl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole-3-thiol (I) was added aliphatic alcohol (methanol, 1-propanol) and 10 drops of hydrochloric acid. Reaction conditions in Milestone Flexi Wave microwave synthesis system: The mixture was heated for 45 minutes at a temperature of 150 °C, a pressure 14.4 bar,  $\Delta MW \approx 200$  W (Fig. 1).

The completeness of the reaction was determined using a gas chromatograph Agilent 7890B with a mass spectrometric detector 5977B.

Analyzing the GS/MS chromatogram in the MS spectrum there was a molecular peak with a value of 347.0 (m/z) (99.9 %), which corresponds to the calculated theo-

retical value of 3-(2-bromophenyl)-5-(methylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole (IIa), and fragment ion peaks 346 (31.1), 344.9 (96.7), 314 (22.4), 312(23.4), 266 (10.5), 260 (9.8), 258 (9.8), 260 (9.8), 258 (9.8), 237.9 (12.5), 236 (12.8), 165 (8.8), 164 (11.8), 132.9 (12.9), 118 (16.6), 117 (20.5), 102 (11.2), 91 (62.2), 77 (34.7), 65 (9.7), 51 (12) (Fig. 2).

3-(2-bromophenyl)-5-(methylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole (IIa). Br. yellow residue; yield 81 %; m. p. 218–220 °C; <sup>1</sup>HNMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ = ppm): δ 2.75 (3H, CH<sub>3</sub>, s), 7.31–7.58 (5H, Ar-H, m), 7.74–7.88 (4H, Ar-H, m); CHNS elemental analysis Calcd. for (C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>BrN<sub>3</sub>S): found C% 51.86, H% 3.48, N% 12.12, S% 9.24; calculated C% 52.03, H% 3.49, N% 12.14, S% 9.26. MH 346.3. Molecular peak 347.0 (m/z) (99.9 %) and fragment ion peaks 346 (31.1), 344.9 (96.7), 314 (22.4), 312 (23.4), 266 (10.5), 260 (9.8), 258 (9.8), 260 (9.8), 258 (9.8), 237.9 (12.5), 236 (12.8), 165 (8.8), 164 (11.8), 132.9 (12.9), 118 (16.6), 117 (20.5), 102 (11.2), 91 (62.2), 77 (34.7), 65 (9.7), 51 (12).

3-(2-bromophenyl)-5-(propylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole (IIb). Br. yellow residue; yield 68 %; m. p. 98–100 °C; <sup>1</sup>HNMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ = ppm): δ 0.96 (3H, CH<sub>3</sub>, t), 1.62 (2H, CH<sub>2</sub>, m), 3.32 (2H, CH<sub>2</sub>, t), 7.31–7.58 (5H, Ar-H, m), 7.74–7.88 (4H, Ar-H, m); CHNS elemental analysis Calcd. for (C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>BrN<sub>3</sub>S): found C% 54.38, H% 4.32, N% 11.27, S% 8.59; calculated C% 54.55, H% 4.31, N% 11.23, S% 8.57. MH 374.3. Molecular peaks 374.0 (13.1), 373 (63.0), 372 (26.3), 371 (60.23), 359 (18.55), 357.9 (99.9), 357 (20.5), 356 (98.7), 190 (24.9), 189 (22), 157 (56.5), 156 (15.6), 136 (13.6), 135 (21.2), 77 (31.9).

3-(2-bromophenyl)-5-(butylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole (IIc). White residue; yield 63 %; m.p. 180–182 °C; <sup>1</sup>HNMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ = ppm): δ 0.92 (3H, CH<sub>3</sub>, t), 1.29–1.43 (4H, 2CH<sub>2</sub>, m), 3.45 (2H, CH<sub>2</sub>, t), 7.29–7.56 (5H, Ar-H, m), 7.74–7.88 (4H, Ar-H, m); CHNS elemental analysis Calcd. for (C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>BrN<sub>3</sub>S): found C% 56.01, H% 4.68, N% 10.84, S% 8.28; calculated C% 55.67, H% 4.67, N% 10.82, S% 8.26. MH 388.3. Molecular peaks 389 (15.4), 388 (14.6), 359 (16.9), 358 (17.8), 341 (99.9), 340 (98.4), 331.9 (86.3), 330.9 (62.4), 252 (24.6), 194 (22.1), 149 (26.8), 91 (29.1), 77 (39.4).

3-(2-bromophenyl)-5-(pentylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole (IIId). White residue; yield 64 %; m. p. 102–104 °C; <sup>1</sup>HNMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ = ppm): δ 0.89 (3H, CH<sub>3</sub>, t), 1.25–1.36 (4H, 2CH<sub>2</sub>, m), 1.40 (2H, CH<sub>2</sub>, t), 3.46 (2H, CH<sub>2</sub>, t), 7.29–7.56 (5H, Ar-H, m), 7.74–7.88 (4H, Ar-H, m); CHNS elemental analysis Calcd. for (C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>3</sub>S): found C% 56.86, H% 5.03, N% 10.46, S% 8.01; calculated C% 56.72, H% 5.01, N% 10.44, S% 7.97. MH 402.3. Molecular peaks 402 (25.6), 401 (19.3), 326.9 (7.0), 282 (9.5), 281 (25.1), 223 (19.8), 177 (99.9), 131 (25.7), 130 (41.7), 113 (20.7), 105 (38.3), 103 (26.4), 85 (30.4), 77 (27.2).

3-(2-bromophenyl)-5-(hexylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole (IIe). Br. yellow residue; yield 64 %; m.p. 94–96 °C; <sup>1</sup>HNMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ = ppm): δ 0.87 (3H, CH<sub>3</sub>, t), 1.20–1.32 (6H, 3CH<sub>2</sub>, m), 1.40 (2H, CH<sub>2</sub>, t), 3.46 (2H, CH<sub>2</sub>, t), 7.29–7.56 (5H, Ar-H, m), 7.74–7.88 (4H, Ar-H, m); CHNS elemental analysis Calcd. for (C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>BrN<sub>3</sub>S): found

C% 57.58, H% 5.36, N% 10.07, S% 7.78; calculated C% 57.69, H% 5.33, N% 10.09, S% 7.70. MH 416.3. Molecular peaks 416.4 (99.9), 414 (34.8) 396.4 (62.5), 381.3 (38.2), 329.3 (28.4), 303.3 (54.6), 255 (47.4), 204.0 (51.3), 161 (35.7), 159.1 (33.8), 145 (39.4), 105 (32.9).

3-(2-bromophenyl)-5-(heptylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole (IIIf). Yellow residue; yield 71 %; m. p. 68–70 °C; <sup>1</sup>HNMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ = ppm): δ 0.87 (3H, CH<sub>3</sub>, t), 1.19–1.32 (8H, 4CH<sub>2</sub>, m), 1.40 (2H, CH<sub>2</sub>, t), 3.46 (2H, CH<sub>2</sub>, t), 7.29–7.56 (5H, Ar-H, m), 7.74–7.88 (4H, Ar-H, m); CHNS elemental analysis Calcd. for (C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>BrN<sub>3</sub>S): found C% 58.74, H% 5.64, N% 9.79, S% 7.41; calculated C% 58.60, H% 5.62, N% 9.76, S% 7.45. MH 430.4. Molecular peaks 431.0 (27.5), 430 (22.7), 347 (47.1), 346 (66.3), 345 (50.9), 343.9 (65.5), 333 (23.7), 331.9 (25.1), 312 (29.9), 285.9 (22.4), 285 (60.2), 284 (34.2), 283 (50.8), 204 (99.9), 183.9 (36.3), 181.9 (27.5), 102 (23.6), 91 (39), 77 (40.7).

3-(2-bromophenyl)-5-(octylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole (IIg). Yellow residue; yield 72 %; m. p. 72–74 °C; <sup>1</sup>HNMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ = ppm): δ 0.91 (3H, CH<sub>3</sub>, t), 1.19–1.32 (10H, 5CH<sub>2</sub>, m), 1.40 (2H, CH<sub>2</sub>, t), 3.46 (2H, CH<sub>2</sub>, t), 7.29–7.56 (5H, Ar-H, m), 7.74–7.88 (4H, Ar-H, m); CHNS elemental analysis Calcd. for (C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>BrN<sub>3</sub>S): found C% 59.32, H% 5.92, N% 9.48, S% 7.24; calculated C% 59.45, H% 5.90, N% 9.45, S% 7.21. MH 444.4. Molecular peaks 444.9 (99.9), 443 (61.2), 384 (32.5), 383 (45.1), 348 (21.8), 347 (23.7), 314 (45.3), 312 (32.4), 235.9 (15.7), 118 (18.3), 117 (9.6), 77 (18.2).

3-(2-bromophenyl)-5-(nonylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole (IIh). Yellow residue; yield 65 %; m. p. 85–87 °C; <sup>1</sup>HNMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ = ppm): δ 0.89 (3H, CH<sub>3</sub>, t), 1.19–1.32 (12H, 6CH<sub>2</sub>, m), 1.40 (2H, CH<sub>2</sub>, t), 3.46 (2H, CH<sub>2</sub>, t), 7.29–7.56 (5H, Ar-H, m), 7.74–7.88 (4H, Ar-H, m); CHNS elemental analysis Calcd. for (C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>BrN<sub>3</sub>S): found C% 60.20, H% 6.12, N% 9.11, S% 6.97; calculated C% 60.26, H% 6.16, N% 9.17, S% 6.99. MH 458.4. Molecular peaks 458.0 (99.9), 457 (68.3), 431 (39.4), 386 (14.7), 331.9 (12.7), 302.0 (9.8), 276 (11.4), 184 (15.3), 183 (29.9), 174 (20.2), 91 (17).

3-(2-bromophenyl)-5-(decylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole (IIi). White residue; yield 73 %; m. p. 65–67 °C; <sup>1</sup>HNMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ = ppm): δ 0.87 (3H, CH<sub>3</sub>, t), 1.19–1.32 (14H, 7CH<sub>2</sub>, m), 1.42 (2H, CH<sub>2</sub>, t), 3.49 (2H, CH<sub>2</sub>, t), 7.29–7.56 (5H, Ar-H, m), 7.74–7.88 (4H, Ar-H, m); CHNS elemental analysis Calcd. for (C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>BrN<sub>3</sub>S): found C% 60.84, H% 6.43, N% 8.84, S% 6.75; calculated C% 61.01, H% 6.40, N% 8.89, S% 6.79. MH 472.4. Molecular peaks 472.0 (46.1), 470 (32.5), 433 (55.7), 432 (41.8), 370 (48.2), 368 (25.7), 331.9 (99.9), 330.9 (86.4), 328 (48.2), 252 (14.6), 149 (18.5), 91 (9.6), 77 (26.9).

Antimicrobial and antifungal activity of 3-(2-bromophenyl)-5-(alkylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazoles (6 new compounds) was investigated.

The most active compound with antifungal and antimicrobial effect was III. Substances IIa–IIe had moderate antimicrobial effect.

## Discussion

The antifungal (*Candida albicans*) and antimicrobial (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) activity of 3-(2-bromophenyl)-5-(alkylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazoles was moderate. The most active compound was 3-(2-bromophenyl)-5-(decylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole (IIIi) (Table 1, 2).

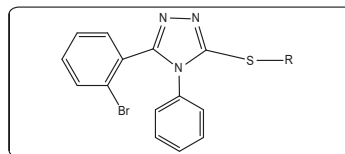
Considering the antifungal activity of 3-(2-bromophenyl)-5-(alkylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazoles, the substances IIIi, IIIe exhibited antifungal effect. MIC and MFcC for substance IIIi are 15.6 µg/ml and 31.25 µg/ml respectively (Fig. 3).

Changing the decyl radical to pentyl reduced antifungal activity. Other compounds have moderate effect.

Also, the antimicrobial activity of compound IIIi to *S. aureus* was the biggest among investigated substances (MIC 7.8 µg/ml, MBcC 15.6 µg/ml).

It was possible to note growth of antimicrobial effect with increase in a carbon radical.

**Table 1.** "Structure – effect" dependence between 3-(2-bromophenyl)-5-(alkylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazoles

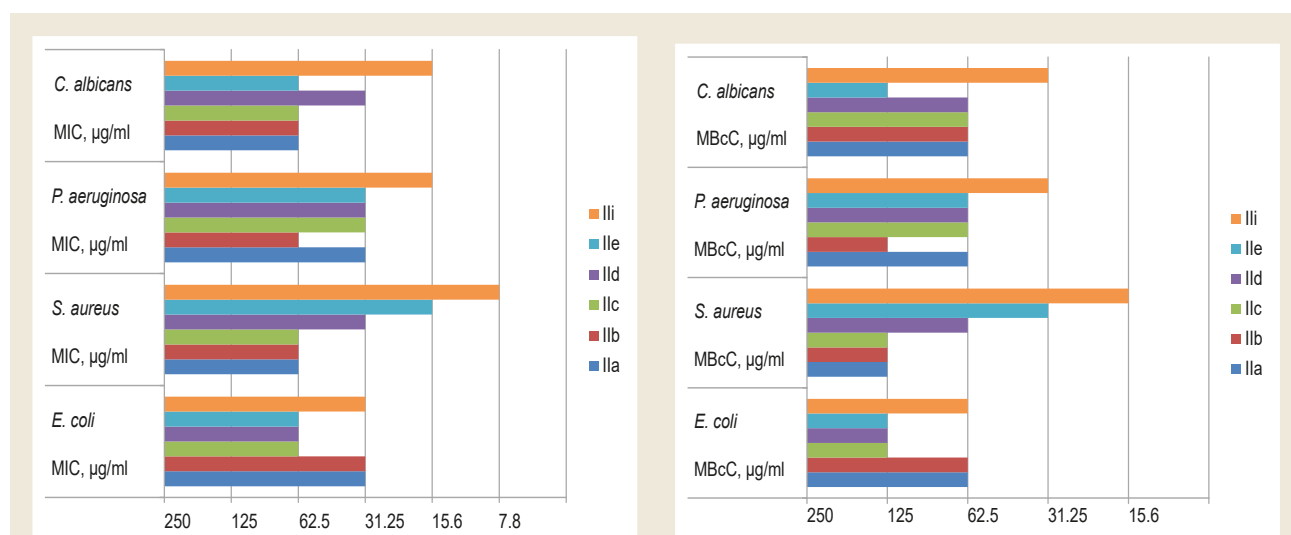


Substance	R	Antimicrobial effect	Antifungal effect
IIa	CH <sub>3</sub>	↑	↔
IIb	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	↔	↔
IIc	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	↔	↔
IIId	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	↑	↑
IIe	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	↑	↔
IIIi	C <sub>10</sub> H <sub>21</sub>	↑↑	↑↑

↑: insignificant effect; ↑↑: significant effect; ↔: no effect.

**Table 2.** The antimicrobial and antifungal activity of 3-(2-bromophenyl)-5-(alkylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazoles

	Antimicrobial activity						Antifungal activity	
	<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>S. aureus</i> ATCC 25923		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853		<i>C. albicans</i>	
	MIC, µg/ml	MBcC, µg/ml	MIC, µg/ml	MBcC, µg/ml	MIC, µg/ml	MBcC, µg/ml	MIC, µg/ml	MFcC, µg/ml
Chlorhexidine	–	25.0	–	18.8	–	200	–	–
Fluconazole							15.6	31.25
IIa	31.25	62.5	62.5	125	31.25	62.5	62.5	62.5
IIb	31.25	62.5	62.5	125	62.5	125	62.5	62.5
IIc	62.5	125	62.5	125	31.25	62.5	62.5	62.5
IIId	62.5	125	31.25	62.5	31.25	62.5	31.25	62.5
IIe	62.5	125	15.6	31.25	31.25	62.5	62.5	125
IIIi	31.25	62.5	7.8	15.6	15.6	31.25	15.6	31.25



**Fig. 3.** The antimicrobial and antifungal activity of 3-(2-bromophenyl)-5-(alkylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazoles.

## Conclusions

1. New 3-(2-bromophenyl)-5-(alkylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazoles were synthesized by two methods. The antimicrobial and antifungal activity was investigated for the obtained compounds. The most active compound was 3-(2-bromophenyl)-5-(decylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole (Ii).

2. Some conclusions were drawn regarding the dependence of “structure – antimicrobial and antifungal effect”: the antimicrobial effect increased with the length of the carbon radical; changing the decyl radical to another one in the molecule 3-(2-bromophenyl)-5-(alkylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole reduced antifungal activity.

## 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 in order to create an antimicrobial drug production”, state registration No. 0120U101649.

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

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

## Information about authors:

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

ORCID ID: [0000-0003-2861-1826](https://orcid.org/0000-0003-2861-1826)

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

ORCID ID: [0000-0002-6102-3455](https://orcid.org/0000-0002-6102-3455)

## Відомості про авторів:

Сафонов А. А., канд. фарм. наук, доцент каф. природничих дисциплін для іноземних студентів та токсикологічної хімії, Запорізький державний медичний університет, Україна.

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

## References

- [1] Kaplaushenko, A. G. (2013). Doslidzhennia zi stvorennia novoho ory-hinalnoho 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].
- [2] Shcherbyna, R. O. (2014). Analiz farmakologichnoi aktivnosti pokhidnykh 1,2,4-triazolu [Analysis of pharmacological activity of 1,2,4-triazole derivatives]. *Farmatsevtichnyi chasopys*, (4), 145-150. [in Ukrainian].
- [3] 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>
- [4] Shcherbyna, R. O., Panasenko, O. I., & Knysh, Ye. H. (2016). Vyvchennia antyoksydantnoi aktivnosti solei 2-((4-R-3-(morpholinometylen)-4H1,2,4-triazol-5-il)tio)atsetatnykh kyslot [The studying of antioxidant activity of salts 2-((4-R-3-(morpholinometylen)-4H-1,2,4-triazole-5-yl) thio)acetic acids]. *Ukrainian Biopharmaceutical Journal*, (1), 37-40. [in Ukrainian].
- [5] Shcherbyna, R. O., Kapelyanovych, Ye. V., Pruhlo, Ye. S., Panasenko, O. I., & Knysh, Ye. H. (2014). Doslidzhennia aktoprotekornoї aktivnosti pokhidnykh 4-R-3-(morpholinometylen)-1,2,4-triazol-5-tiolu [The studying of actoprotective action of 4-R-3-(morpholinometylene)-1,2,4-triazole-5-thiole derivatives]. *Odeskyi medychnyi zhurnal*, (6), 19-22. [in Ukrainian].
- [6] Murty, M. S. R., Ram, K. R., Rao, R. V., Yadav, J. S., Rao, J. V., & Velatooru, L. R. (2012). Synthesis of new S-alkylated-3-mercapto-1,2,4-triazole derivatives bearing cyclic amine moiety as potent anticancer agents. *Letters in Drug Design & Discovery*, 9(3), 276-281. <https://doi.org/10.2174/157018012799129882>
- [7] Can, N. Ö., Acar Çevik, U., Sağlık, B. N., Levent, S., Korkut, B., Özkay, Y., & Koparal, A. S. (2017). Synthesis, Molecular Docking Studies, and Antifungal Activity Evaluation of New Benzimidazole-Triazoles as Potential Lanosterol 14 $\alpha$ -Demethylase Inhibitors. *Journal of Chemistry*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9387102>
- [8] Singh, R., Kashaw, S., Mishra, V., Mishra, M., Rajoriya, V., & Kashaw, V. (2018). Design and synthesis of new bioactive 1,2,4-triazoles, potential antitubercular and antimicrobial agents. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 80(1), 36-45. <https://doi.org/10.4172/pharmaceutical-sciences.1000328>
- [9] Samelyuk, Yu. H., & Kaplaushenko, A. H. (2015). Hostra toksychnist 5-(2-, 3-, 4-metoksyfenil, (3,4,5-trymetoksyfenil)-)-1,2,4-triazol-3-tioniv ta yikh tiopokhidnykh [Acute toxicity of 5-(2-, 3-, 4-methoxyphenyl, (3,4,5-trimethoxyphenyl)-)-1,2,4-triazole-3-thiones and their thiode-derivatives]. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*, (3), 57-60. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2015.3.52660>
- [10] Suhak, O. A., Panasenko, O. I., Knysh, Ye. G., & Kamyshny, O. M. (2015). Protymikrobna ta protyhrybkova aktivnost pokhidnykh 3-(alkiltio)-4-R-5-(tiofen-2-ilmetyl)-4H-1, 2, 4-triazoliv [Antibacterial and antifungal activity of derivatives 3-(alkylthio)-4-R-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-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>
- [11] Safonov, A. A., & Nevmyvaka, A. V. (2020). Synthesis of novel 3-(2-bromophenyl)-4-substituted-1H-1,2,4-triazole-5(4H)-thiones derivatives. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*, 13(1), 11-16. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2020.1.198087>
- [12] Volianskyi, Yu. L., Hrytsenko, I. S., Shyrobokov, V. P. et al. (2004). Vyvchennia spetsyfichnoi aktivnosti protymikrobnykh likarskykh zasobiv [Study of the specific activity of antimicrobial drugs]. *Derzhavnyi farmakologichnyi tsentr*. [in Ukrainian].



# Фармакогностичні дослідження трави *Trifolium fragiferum* L. флори півдня України

О. В. Гречана <sup>ID</sup>\*1,A,D, А. Г. Сербін <sup>ID</sup>2,C,F, О. О. Салій <sup>ID</sup>3,A,C, А. М. Рудник <sup>ID</sup>1,A,E, І. М. Шевченко <sup>ID</sup>1,D, Л. А. Фуклева <sup>ID</sup>1,E

<sup>1</sup>Запорізький державний медичний університет, Україна, <sup>2</sup>Сумський національний аграрний університет, Україна, <sup>3</sup>Київський національний університет технологій та дизайну, Україна

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

Робота присвячена дослідженню надземної частини представника роду конюшина флори півдня України *Trifolium fragiferum* L.

**Мета роботи** – дослідження надземної частини представника флори півдня України конюшини сунічної, що має достатню сировинну базу та історію використання в народній медицині.

**Матеріали та методи.** Зразки вирощували в передмісті Запоріжжя та заготовляли у період повного цвітіння (травень – червень). Мікроскопічний аналіз виконали з тимчасовими препаратами листка та стебел. Рослинні екстракти аналізували хроматографічно, використовуючи газовий хроматограф Agilent Technologies 6890 із мас-спектрометричним детектуванням.

**Результати.** Листок вкритий паренхімними клітинами з ледь потовщеними оболонками з аноміцитними продирами. Основна паренхіма складена з округлих тонкостінних клітин. Стебло округле, вкрите видовженими паренхімними клітинами з тонкими оболонками майже без продихів та опушення. Центральний осьовий циліндр пучкового типу. Пучки відкриті колатеральні, крупні. Над флоемою пучків є багатшарова склеренхіма. Серцевина частково виповнена, в центрі порожниста. У нативному екстракті виявлено 63 сполуки, з них ідентифікували 37: кумарини, жирні кислоти, дитерпенові спирти, оксигеновані вуглеводні терпеноїдної природи, вищі вуглеводні, представники фітостеролів і фітостеринів. Після кислотного гідролізу кислотою сульфатною знайдено 58 сполук, з них ідентифікували 49: кумарини, спирти та феноли, альдегіди та кетони, сполуки дитерпенової природи.

**Висновки.** Фармакогностичний аналіз представника роду конюшина *Trifolium fragiferum* L. дав змогу встановити діагностичні мікроскопічні ознаки листка та стебла. Порівняли компоненти нативного екстракту та після його кислотного гідролізу. Визначили закономірності розподілу класів речовин, що характеризували лише певний тип екстракту. Так, монотерпеноїди, ароматичні, гетероциклічні сполуки виявили в гідролізованому продукті, а сесквітерпени та стероїдні сполуки – тільки в нативному екстракті трави конюшини сунічної. Спирти, альдегіди та кетони становили більшість у гідролізованому екстракті, а вуглеводнів виявили більше у нативному. Лише 5 компонентів ідентифіковано в обох витягах: наокозан, 2-феноксіетанол, лоліолід, дигідроактинідіолід і кумарин, що істотно відрізнялися за кількістю.

**Ключові слова:** мікроскопічна діагностика, фітохімія, хімічний склад, *Trifolii fragiferi* трава.

**Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики.** 2022. Т. 15, № 3(40). С. 241–249

## Pharmacognostic studies of *Trifolium fragiferum* L. flora of Southern Ukraine

O. V. Grechana, A. H. Serbin, O. O. Saliy, A. M. Rudnyk, I. M. Shevchenko, L. A. Fukleva

The work is devoted to the study of herbs of the representative genus Clover *Trifolium fragiferum* L. from the south Ukrainian flora.

**The aim** of this research is to investigate the representative of Southern Ukraine flora *Trifolium fragiferum* L. which has a sufficient raw material base and use in folk medicine.

**Materials and methods.** Samples were grown in the suburbs of Zaporizhzhia and harvested during full flowering (May – June). Microscopic analysis was performed with temporary preparations of leaves and stems. Plant extracts were analyzed chromatographically using an Agilent Technologies 6890 gas chromatograph with mass spectrometric detection.

**Results.** The leaf is covered with parenchymal cells with slightly thickened membranes with anocytic stomata. The main parenchyma is composed of rounded toxoid cells. Stem rounded, covered with elongated parenchymal cells with thin membranes with almost no stomata and pubescence. Central axial cylinder is of beam type. Beams are open collateral, large. Above the phloem of the bundles is a multilayered sclerenchyma. The core is partially filled, hollow in the center. 63 compounds were found in the native extract, of which 37 were identified: coumarins, fatty acids, diterpene alcohols, oxygenated hydrocarbons of terpenoid nature, higher hydrocarbons, representatives of phytosterols, and phytosterols. After acid hydrolysis with sulfuric acid, 58 compounds were found, of which 49 were identified: coumarins, alcohols and phenols, aldehydes and ketones, compounds of diterpene nature.

### ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/259400>

UDC 615.322:582.736.3].07(477.7)

DOI: [10.14739/2409-2932.2022.3.259400](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2022.3.259400)

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 241–249

**Key words:** chemical composition, microscopic diagnostics, phytochemistry, *Trifolium fragiferum* herb.

\*E-mail: [elenagrechanaya1310@gmail.com](mailto:elenagrechanaya1310@gmail.com)

Received: 27.07.2022 // Revised: 17.08.2022 // Accepted: 22.08.2022

**Conclusions.** Pharmacognostic analysis of the genus Clover *Trifolium fragiferum* L. revealed diagnostic microscopic signs of leaves and stems. The components of the native extract are compared, and after its acid hydrolysis. Certain regularities in the distribution of classes of substances that characterized certain types of extracts were revealed: monoterpenoids, aromatic, heterocyclic compounds characterized the hydrolyzed product. Sesquiterpenes and steroid compounds are found only in the native extract of strawberry clover herb. Alcohols, aldehydes, and ketones were the majority in the hydrolyzed extract, and hydrocarbons were observed more in the native. Only 5 components were identified in both extracts: nonacosan, 2-phenoxyethanol, loliolide, dihydroactinidiolide and coumarin with significant differences in amounts.

**Key words:** chemical composition, microscopic diagnostics, phytochemistry, *Trifolium fragiferum* herb.

**Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 241–249**

Одна з найбільших родин серед квіткових рослин – бобові (*Fabaceae* L. або *Leguminosae* L.), включає 600–700 родів і понад 12–17 тис. однорічних і багаторічних видів трав, чагарників, ліан, рідше дерев, що здебільшого характерні для тропіків [1–3]. Україна є ареалом для понад 60 родів і 1800 видів цієї родини [2].

На заплавах луках, степових схилах та узліссях Європейського континенту ростуть численні представники роду конюшина (*Trifolium* L.), вищі покритонасінні багаторічні трав'янисті рослини родини *Fabaceae* L. [4–6]. На території південної частини України трапляється чимало видів конюшини, але Державна фармакопея України включає один – *Trifolium pratense* L. Його лікарською рослиною сировиною є суцвіття, що зрізають разом із верхівковим листям під час повного цвітіння рослин [7,8].

У фаховій літературі наведено детальні рекомендації щодо ідентифікації типового зразка *Trifolium pratense* у природі та серед гербарних зразків. Проте в природі зростає багато проміжних (перехідних) форм та інших видів, що поєднують ознаки *T. pratense* (*T. repens*, *T. incarnatum*); це серйозно ускладнює закладку гербарних зразків та ідентифікацію в природі [5,9–11].

Зазначимо, що ретельний ботанічний опис морфології та анатомії рослини не збігається з фармакогностичними діагностичними ознаками під час товарознавчого аналізу лікарської рослинної сировини та її ідентифікації.

Ця робота присвячена дослідженню надземної частини іншого представника роду конюшина з достатніми ресурсами на півдні України, а саме конюшини суничної (*Trifolium fragiferum* L.) – багаторічної низькорослої рослини з повзучими стеблами, що вкорінюються в вузлах. Росте здебільшого на вологих, погано дренованих ґрунтах, часто засоленіх. Жилки листка конюшини суничної мають характерні сполучення з прожилками; на черешках і жилках є трихоми з нижнього боку листка. Прилистки здебільшого помітні, поступово звужуються до верхівки. Суцвіття кулясте, компактне, з рожевими або фіолетово-червоними квітками; є 1–2 серцеподібних світло-коричневих насінини з темно-коричневими крапленнями.

Із попередніх досліджень відомо, що види *Trifolium* багаті на білки, є дані про вміст великої кількості біологічно активних вторинних метаболітів. Автори зосереджувалися на розділенні трьох ізофлавонів: формонетину, дайдеїну і геністеїну – у 11 багаторічних і 4 однорічних видах *Trifolium*. Виявили таку тенденцію загальних концентрацій ізофлавонів у листках, стеблах і квітках конюшин багаторічних: *T. medium* (6,01 мг/г, 3,50 мг/г та 2,93 мг/г відповідно) > *T. pratense* > *T. fragiferum* >... [12,13].

Ціаногенні глікозиди лотавстралін і лінамарин у надземній частині конюшини суничної виявили польські дослідники. Порівняльний аналіз *in vitro* властивостей поглинання вільних радикалів екстрактів видів *Trifolium* показав, що конюшина сунична може бути джерелом сильних антиоксидантів у фенольній фракції, виділеній з надземної частини *T. fragiferum* [14].

Виявили нові дані щодо впливу рослини на компоненти крові. Здійснили порівняльний аналіз *in vitro* антитромбоцитарних властивостей фенольної фракції *T. fragiferum*, виявили інгібувальну дію рослинного препарату на активацію тромбоцитів крові. Народна медицина використовує траву *T. fragiferum* L. при диспепсіях, зовнішньо – для лікування ран та опіків [15,16].

## Мета роботи

Дослідження надземної частини представника флори півдня України конюшини суничної, що має достатню сировинну базу та історію використання в народній медицині.

## Матеріали і методи дослідження

Під час дослідження застосовували хлоралгідрат кристалічний 99,5–101,0 % фармакопейної чистоти в оригінальній упаковці виробництва Sigma (Німеччина), а також хлористий метилен (метиленхлорид або хлористий метан) 99,9 % чистий для аналізу виробництва Merck (Erba Lachema, Німеччина). Крім того, використовували тридекан (чистоти для аналізу  $\geq 99\%$ ) і кислоту сульфатну (ступінь чистоти для аналізу – 99,99 %) виробництва Sigma-Aldrich (Німеччина), натрію гідроксид кристалічний 98 %, хімічно чистий виробництва Brenntag СЕЕ GmbH (Австрія).

Рослини *Trifolium fragiferum* L., які заготовляли для досліджень, вирощені з колекційного насіння кафедри ботаніки Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна в передмісті Запоріжжя (село Приморське – 47°37'28" пн. ш., 35°17'39" сх. д.) у 2019–2021 рр. Рослини культивували за однакових умов, заготовляли в тому самому періоді, щоб виключити залежність змін структури сировини й епідермісу листя від навколишніх, сезонних метеорологічних умов, віку в фенологічний період повного цвітіння (травень – червень). Попередньо підсушену сировину досушували під укриттям або в добре провітрюваному місці, стежили за тим, щоб суцвіття не пересохли та не осипалися. Одержали 20 % сухої сировини.



Ідентифікацію виду підтвердили на кафедрі ботаніки Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, Україна (завідувач кафедри, зберігач гербарію – доцент Ю. Г. Гамуля).

Для мікроскопічного аналізу використали тимчасові препарати листка та стебел, що попередньо кип'ятили в розчині гідроксиду натрію (5 %, вод.) без використання барвників. Поперечні зрізи зробили лезом [17]. На тимчасових препаратах визначили форму клітин епідермісу, тип продихової системи, судинну тканину, структуру трихом, залозистих (секреторних) трихом тощо.

Препарати досліджували на мікроскопі Axioskop 40 (Zeiss, Німеччина), фотографії зробили камерою Canon PS G7 (Японія). Тип апарату продихів визначали за класифікацією М. О. Баранової, опис клітин епідермісу здійснили за відомими методиками [18–20].

**Дослідження нативного екстракту.** До наважки рослинного матеріалу *Trifolium fragiferum* L. (50–100 мг), попередньо подрібненого до порошкоподібного стану, додавали 50 мкг додекану як внутрішнього стандарту й екстрагенту (хлористий метилен). Екстрагували протягом доби за кімнатної температури, переливали екстракт у віалу на 2 мл й упарювали до об'єму 0,1 мл. Одержаний екстракт відбирали хроматографічним шприцом.

Екстракт аналізували хроматографічно, використовуючи газо-рідинний хроматограф Agilent Technologies 6890 (Agilent, США). Детектування здійснили в автоматичному режимі за допомогою мас-спектрометричного детектора. Хроматограф обладнано хроматографічною колонкою капілярною (ферула – графіт) із внутрішнім діаметром 0,25 мм і завдовжки 30 м. Газ-носії – гелій зі швидкістю подачі 1,2 мл/хв. Проби попередньо нагрівали.

Температуру термостата градієнтно програмували зі швидкістю 4 °С/хв.

Для ідентифікації компонентів використали бібліотеку мас-спектрів NIST05 і WILEY 2007 із загальною кількістю спектрів понад 470 000 в поєднанні з програмами для ідентифікації AMDIS і NIST. Для кількісних розрахунків застосували метод внутрішнього стандарту. Розраховували вміст компонентів (мг/кг) за формулою:

$$C = K_1 \times K_2, \quad (1)$$

де  $K_1 = S_1 / S_2$ ;  $S_1$  – площа піка досліджуваної сполуки;  $S_2$  – площа піка стандарту;  $K_2 = 50 / M$ ; 50 – маса внутрішнього стандарту, мкг, введеного в зразок;  $M$  – наважка зразка, г.

**Дослідження гідролізованого екстракту.** Наважку рослинного матеріалу (100 мг) подрібнювали до порошкоподібного стану, заливали водою (2 мл), додавали тридекан як внутрішній стандарт і 3 крапліни 10 % розчину кислоти сульфатної. Витримували за температури 50 °С протягом 8 годин для гідролізу зв'язаних компонентів. Суміш охолоджували, додавали 2 мл хлористого метилену. Компоненти екстрагували легким струшуванням протягом 2 годин. Хлористий метилен відбирали та випарювали до об'єму 50 мкл.

Аналіз, кількісні розрахунки здійснювали так само, як попередні.

## Результати

Під час мікроскопічного дослідження надземної частини конюшини суничної виявлені такі особливості будови: клітини верхньої епідерми листка округлі, невеликі, паренхімні з ледь потовщеними оболонками (рис. 1А, а); продихи часті (рис. 1А, б), оточені трьома, рідше чотирма біляпродиховими клітинами; тип продихового апарату – аномоцитний.

Клітини нижньої епідерми більші, зі звивистими оболонками (рис. 1В, а). Опушення верхньої епідерми немає, нижньої – рідке, утворене довгими одноклітинними трихомами (рис. 1С, а).

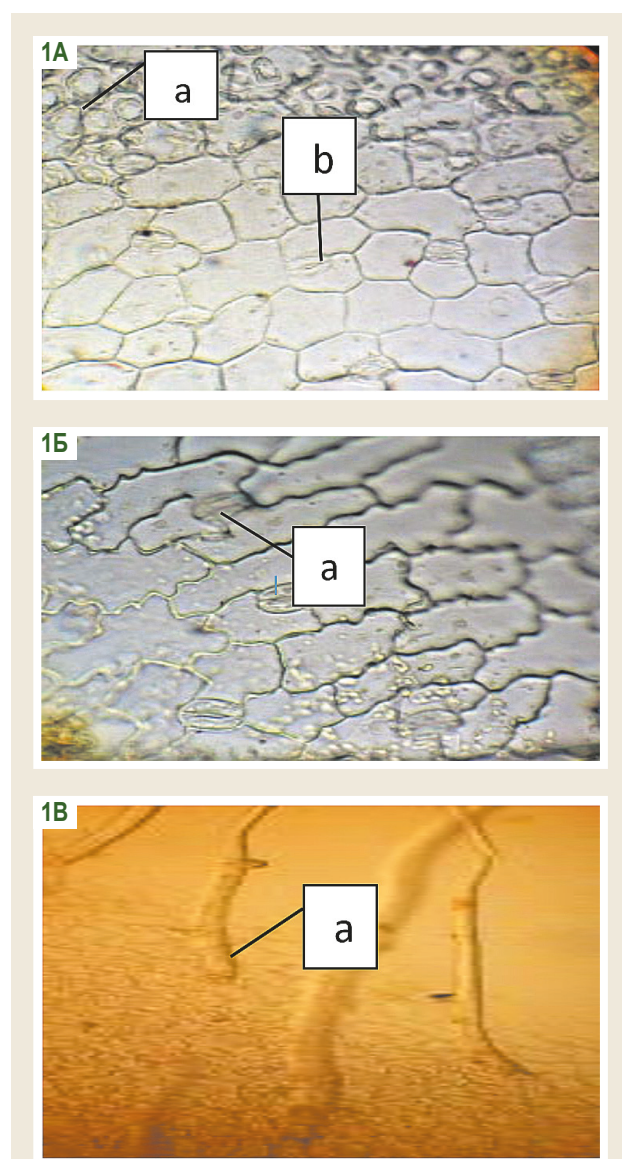
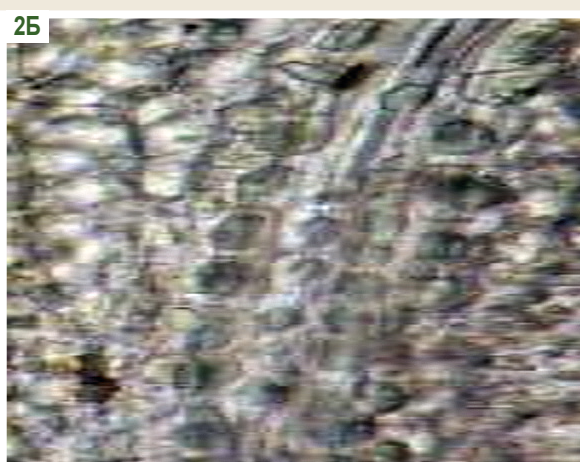
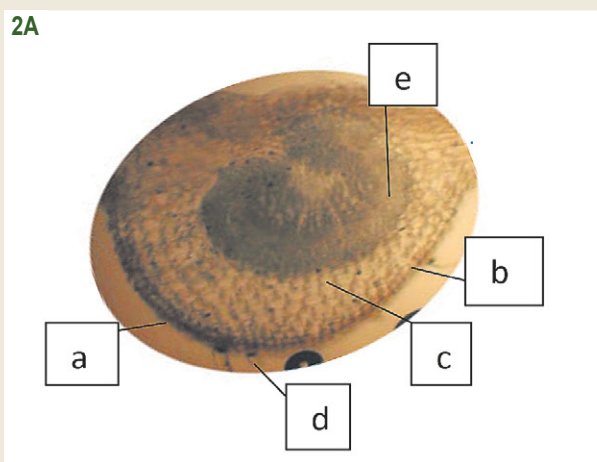
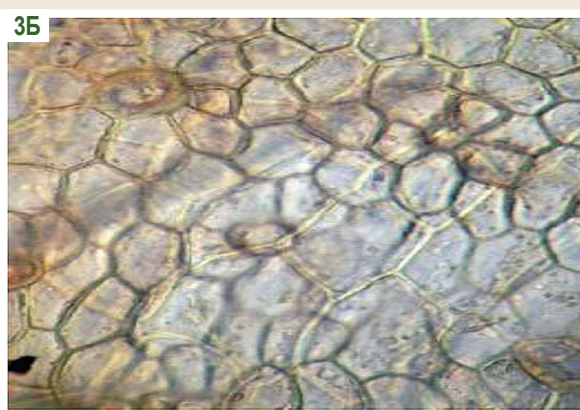
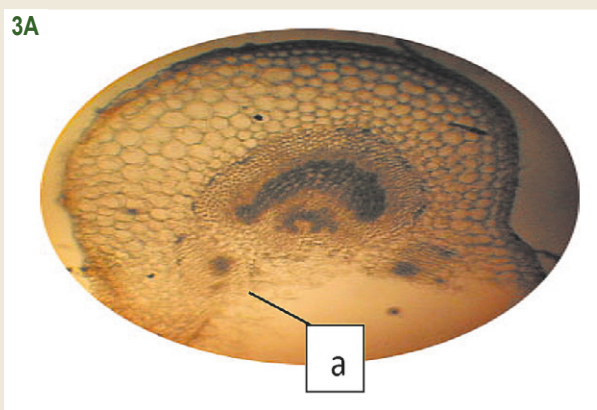


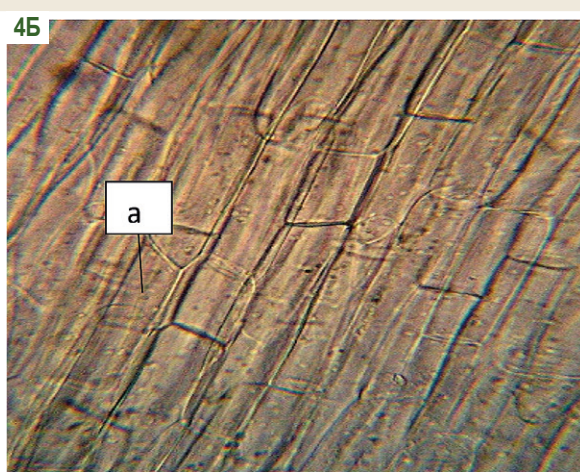
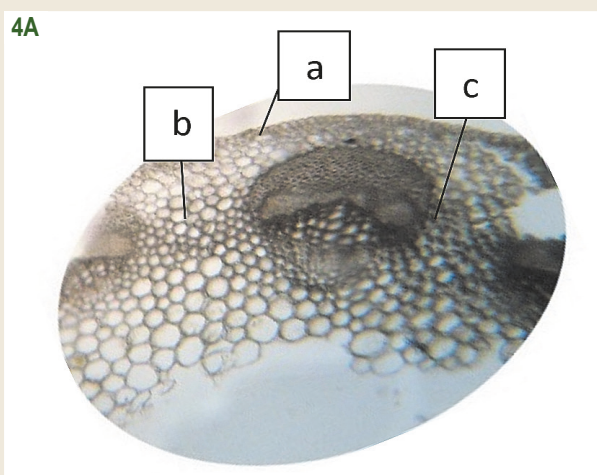
Рис. 1. Фрагменти епідерми листка *Trifolium fragiferum* L. А. Верхня епідерма. а: паренхімні клітини; б: продих аномоцитного типу. В. Нижня епідерма. а: звивистостінні клітини. С. Трихоми на поверхні листка. а: трихома.



**Рис. 2.** Фрагменти жилки листка *Trifolium fragiferum* L. **А.** Поперечний зріз. **а:** опуклість з нижнього боку листка; **б:** епідерма; **с:** основна паренхіма; **д:** трихоми; **е:** закритий колатеральний провідний пучок. **В.** Кристалоносна обкладинка жилки.



**Рис. 3.** Фрагменти черешка листка. **А.** Поперечний зріз. **а:** одноклітинні трихоми. **В:** епідерма.



**Рис. 4.** Фрагменти стебла. **А.** Поперечний зріз. **а:** епідерма; **б:** основна паренхіма; **с:** провідний пучок. **В.** Епідерма. **а:** прорих аномоцитного типу.

Жилка листка округла, значно опукла з нижнього боку листка (рис. 2А, а). Епідерма жилки складається з паренхімних тонкостінних клітин (рис. 2А, б). Опушення жилки рідке, утворене трихомами на нижній епідермі (рис. 2А, д). Під епідермою – основна паренхіма з округлими тонкостінними клітинами (рис. 2А, с). В центрі жилки є

один великий закритий колатеральний провідний пучок (рис. 2А, е). У жилці з нижнього боку листка конюшини сунічної розташована кристалоносна обкладинка, утворена поодинокими кристалами кальцію оксалату (рис. 2В).

Черешок округлої форми (рис. 3А), вкритий епідермою (рис. 3В) – паренхімними, прямиостінними клітинами

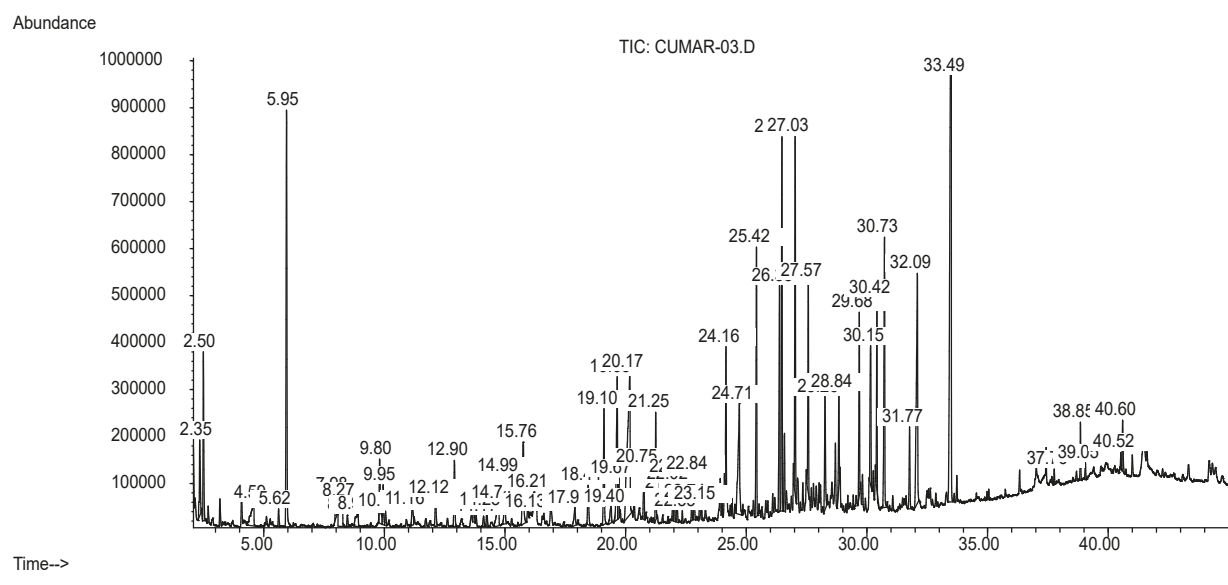


Рис. 5. Хроматограма нативного екстракту конюшини суничної.

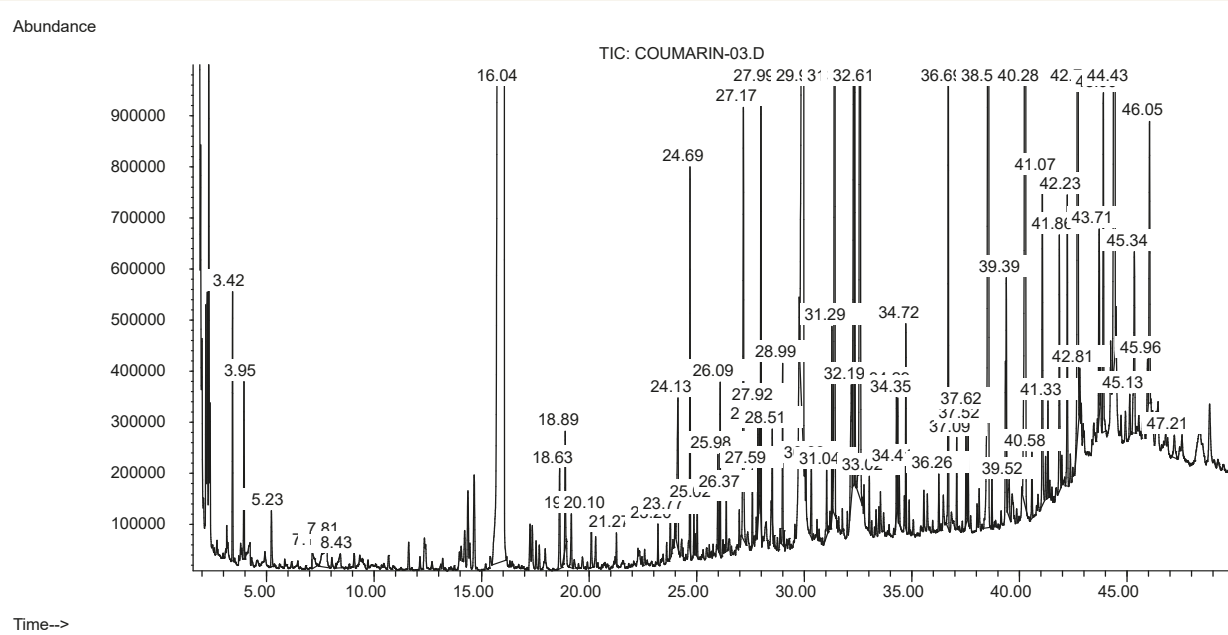


Рис. 6. Хроматограма екстракту конюшини суничної після гідролізу.

з потовщеними оболонками. Під епідермою – основна паренхіма з округлими тонкостінними клітинами. У центрі розташований один закритий колатеральний провідний пучок. Опущення черешка середнє, волоски довгі, одноклітинні, біля основи мають розетку з базисних епідермальних клітин (рис. 3А, а).

Стебло *Trifolium fragiferum* L. округлої форми (рис. 4А). Клітини епідерми видовжені, паренхімні або прозенхімні з тонкими оболонками (рис. 4В). Продихи трапляються рідко (рис. 4В, а). Продиховий апарат аноміцитарного типу. Опущення стебла немає. Під епідермою (рис. 4А, а) стебла – основна паренхіма (рис. 4А, б), що складається з округлих

тонкостінних клітин. Центральний осьовий циліндр пучкового типу. Пучки (рис. 4А, с) відкриті колатеральні, великі.

Над флоемою пучків є багатшарова склеренхіма, що менш виражена з боку ксилеми. Серцевина частково виповнена основною паренхімою, в центрі порожниста.

**Хроматографічне дослідження компонентів конюшини суничної.** У нативному екстракті конюшини суничної (рис. 5) виявили 63 сполуки в кількості 781,00 мг у 1000 г, із них ідентифікували 37.

Під час газової хроматографії сировини конюшини суничної після кислотного гідролізу виявили 58 сполук (3748,00 мг у 1000 г), із них ідентифікували 49 (рис. 6).

## Обговорення

З-поміж сполук із класу істинних кумаринів у заготовлених надземних частинах конюшини суничної ідентифікували кумарин (0,15 мг %). Встановили кількість компонентів, що належать до класів жирних кислот, а саме пальмітинової та ліноленої кислоти – 9,25 мг % та 3,82 мг % відповідно.

У сировині конюшини суничної під час газової хроматографії ідентифікували біологічно активні органічні сполуки з різних класів: дитерпеновий спирт фітол (5,52 мг %), що має C<sub>20</sub> вуглеводневий скелет, утворений чотирма ізопреновими ланками, поширений у зелених рослинах як компонент молекул хлорофілу, де він міститься як складний ефір і вітаміни Е, К; оксигеновані вуглеводні терпеноїдної природи цис-неофітадієн (1,66 мг %), гексагідрофарнезилацетон (1,44 мг %); вищі вуглеводні наокозан (9,03 мг %), гептакозан (1,46 мг %); представники фітостеролів і фітостеринів гентріаконтан (9,08 мг %), стигмастерол (1,13 мг %) та  $\gamma$ -ситостерол (6,22 мг %).

У рослинному матеріалі конюшини суничної після гідролізу (у зв'язаному стані) ідентифікували компоненти класу кумаринів: дигідрокумарин (3,10 мг %), кумарин (14,60 мг

%), 7-оксикумарин (20,90 мг %) і скополетин (55,2 мг %). Загалом вони становили 25 % від загальної маси речовин.

Привертає увагу кількість компонентів, що належать до класу спиртів і фенолів – 2-феноксіетанол (45,0 мг %); альдегідів і кетонів – 3-етил-4-метил-1*H*-пірол-2,5-діон (11,1 мг %) і фурфурол (25,20 мг %), сполуки дитерпенової природи дигідроактинидіолід, лоліолід (19,80 мг % і 17,20 мг % відповідно), 3-окси- $\beta$ -дамаскон (10,9 мг %).

Виявили високий вміст одноосновної граничної карбонової кислоти оксоноанової (12,6 мг %) та монокарбонової фенольної саліцилової (25,5 мг %).

Цінний компонент екстракту конюшини суничної після кислотного гідролізу – 3-окси- $\beta$ -дамаскон, кетон троянди (10,9 мг %), що є представником терпенових сполук, продукт перетворень  $\beta$ -каротину.

У результаті порівняльного аналізу компонентів обох витягів виявили: деякі класи речовин характерні лише для певного типу екстракту. Так, монотерпеноїди, ароматичні, гетероциклічні сполуки характеризували гідролізований продукт, а сесквітерпени та стероїдні сполуки виявили тільки в нативному екстракті трави конюшини суничної (табл. 1).

Таблиця 1. Порівняльна характеристика екстрактів конюшини суничної, мг/1000 г

№ з/п	Назва речовини	Нативний екстракт	Гідролізований продукт	№ з/п	Назва речовини	Нативний екстракт	Гідролізований продукт
<b>Вуглеводні</b>				<b>Сесквітерпени</b>			
1	монотерпени	3,3	–	41	гексагідрофарнезилацетон	14,4	41,0
2	пентадекан	0,8	–	<b>Дитерпени</b>			
3	октадекан	1,6	–	42	дигідроактинидіолід	4,9	198,0
4	гентріаконтан	90,8	–	43	цис-неофітадієн	16,6	–
5	нонакозан	90,3	25,0	44	транс-неофітадієн	2,3	–
6	пентакозан	5,3	–	45	цис,транс-неофітадієн	1,9	–
7	гептакозан	14,6	–	46	фітол	55,2	–
<b>Спирти і феноли</b>				<b>Лактони</b>			
8	$\beta$ -фенілетиловий спирт	–	37,0	47	$\gamma$ -капролактон	–	12,0
9	бензиловий спирт	–	22,0	48	бутиролактон	–	–
10	2-метокси-4-вінілфенол	–	57,0	49	мальтол	–	83,0
11	1-октен-3-ол	–	14,0	50	лоліолід	2,5	172,0
12	2-феноксіетанол	4,0	77,0	<b>Тритерпенові сапоніни</b>			
13	4-(3-окси-1-пропеніл)-2-метоксифенол	–	86,0	51	$\beta$ -амірин	8,9	–
<b>Альдегіди і кетони</b>				52	$\alpha$ -амірин	10,7	–
14	3-метилбутанон-2	–	50,0	53	сквален	–	9,0
15	метилізопропенілкетон	–	84,0	54	лупеол	2,3	–
16	пірол-2,5-діон	2,3	–	<b>Стероїди</b>			
17	2-гексеналь	–	10,0	55	кемпестерол	7,2	–
18	2-гептеналь	–	7,0	56	стигмастерол	11,3	–
19	фурфурол	–	252,0	57	$\gamma$ -ситостерол	62,2	–
20	5-метилфурфурол	–	10,0	<b>Ароматичні сполуки</b>			
21	бензальдегід	–	51,0	58	цис-ізоевгенол	–	15,0

Продовження таблиці 1.

№ з/п	Назва речовини	Нативний екстракт	Гідролізований продукт	№ з/п	Назва речовини	Нативний екстракт	Гідролізований продукт
22	пара-оксибензальдегід	–	12,0	<b>Похідні гетероциклічних сполук</b>			
23	фенілацетальдегід	–	45,0	59	5-пентил-2(5H)-фуранон	–	7,0
24	3-етеніл-4-метил-1H-пірол-2,5-діон	–	32,0	60	дигідро-5-пентил-2(3H)-фуранон	–	10,0
25	3-етил-4-метил-1H-пірол-2,5-діон	–	111,0	<b>Карбонові кислоти та їх ефіри</b>			
26	4-окси-3,5,5-триметил-4-(3-оксо-1-бутеніл)-2-циклогексен-1-он	–	79,0	61	гексанова кислота	4,9	60,0
27	6-метил-3,5-гептадієн-2-он	–	8,0	62	гексенова кислота	1,5	–
28	індол-5-альдегід	–	46,0	63	2-гексенова кислота	–	24,0
29	бузковий альдегід	–	48,0	64	гептадеканова кислота	2,3	–
30	ванілін	–	63,0	65	додеканова кислота	7,8	–
<b>Домішка</b>				66	стеаринова кислота	25,1	–
31	фталат	2,3+4,6	–	67	ейкозанова кислота	1,6	–
32	ізопропіллаурат (домішка)	9,8	–	68	каприлова кислота	–	37,0
33	диметилсульфоксид	1,7	–	69	капринова кислота	–	18,0
<b>Кумарини</b>				70	олеїнова кислота	7,2	–
34	кумарин	1,5	146,0	71	пентадеканова кислота	2,0	–
35	дигідрокумарин	–	31,0	72	пальмітинова кислота	92,5	90,0
36	7-оксикумарин	–	209,0	73	фенілоцтова кислота	–	18,0
37	скополетин (7-окси-6-метоксикумарин)	–	552,0	74	саліцилова кислота	–	255,0
<b>Терпеноїди</b>				75	лінолева кислота	16,4	–
<b>Монотерпеноїди</b>				76	ліноленова кислота	38,2	–
38	транс-ліналоолуксид	–	17,0	77	9-оксононанова кислота	–	126,0
39	2-окси-β-дамаскон	–	74,0	78	ізовалеріанова кислота	–	49,0
40	3-окси-β-дамаскон	–	109,0				

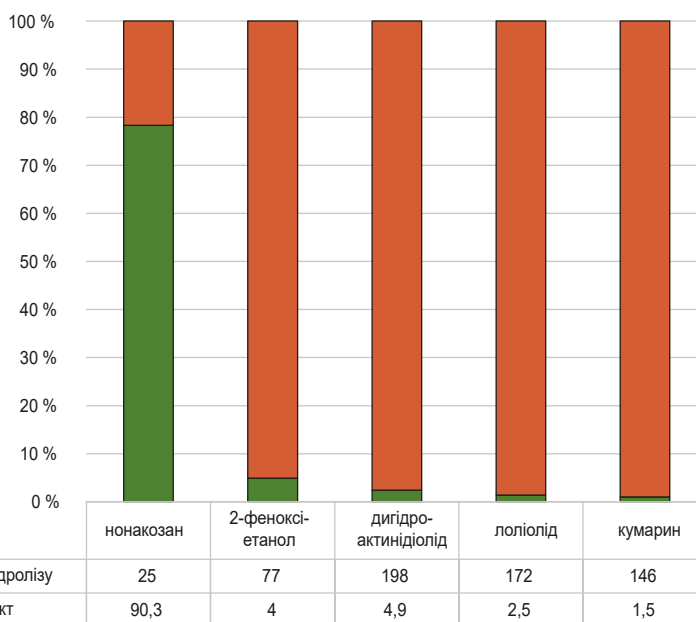


Рис. 7. Ідентичні сполуки обох екстрактів конюшини суничної.

Встановили, що спирти, альдегіди та кетони накопичуються переважно в гідролізованому екстракті, а сполук із класу вуглеводнів більше в нативному.

Крім того, з-поміж 78 компонентів тільки 5 ідентифікували в обох витягах: наокозан, 2-феноксіетанол, лоліолід, дигідроактинідіолід і кумарин (рис. 7). Кількість цих сполук змінюється у широкому діапазоні: вищий насичений парафін наокозан зменшується в 3,72 раза, спирт 2-феноксіетанол, дитерпен дигідроактинідіолід, лактон лоліолід і кумарин збільшуються у 19,25, 40,41, 68,8 і 97,33 раза відповідно.

## Висновки

1. Здійснили фармакогностичний аналіз представника роду конюшина *Trifolium fragiferum* L.

2. Встановили діагностичні фармакогностичні, мікроскопічні ознаки листка та стебла, порівняли компоненти нативного екстракту з надземної частини рослини та після його кислотного гідролізу.

3. Визначили закономірності розподілу класів речовин, що характеризували лише певний тип екстракту. Так, монотерпеноїди, ароматичні, гетероциклічні сполуки виявили в гідролізованому продукті, а сесквітерпени та стероїдні сполуки – тільки в нативному екстракті трави конюшини сунічної. За накопиченням спиртів, альдегідів та кетонів переважав гідролізований екстракт, більше вуглеводнів виявили в нативному.

4. З-поміж 78 компонентів тільки 5 ідентифікували в обох витягах: наокозан, 2-феноксіетанол, лоліолід, дигідроактинідіолід і кумарин, – що мали істотну різницю за кількістю.

## Фінансування

Робота виконана у рамках НДР Запорізького державного медичного університету: «Пошук та дослідження нових джерел лікарської рослинної сировини, створення субстанцій та лікарських засобів на їх основі», № держреєстрації 0120U102600.

## Подяка

Колектив авторів дякує ректорові Запорізького державного медичного університету Ю. М. Колеснику за надану можливість здійснювати експерименти, а також колегам з кафедри фармакогнозії, фармакології і ботаніки за допомогу.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

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

## Відомості про авторів:

Гречана О. В., канд. фарм. наук, доцент каф. фармакогнозії, фармакології та ботаніки, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0002-1756-6372](https://orcid.org/0000-0002-1756-6372)

Сербін А. Г., д-р фарм. наук, професор каф. фармації, Сумський національний аграрний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0002-6247-7520](https://orcid.org/0000-0002-6247-7520)

Салій О. О., канд. фарм. наук, доцент каф. промислової фармації, Київський національний університет технологій та дизайну, Україна.

ORCID ID: [0000-0001-7103-2083](https://orcid.org/0000-0001-7103-2083)

Рудник А. М., канд. фарм. наук, доцент каф. фармакогнозії, фармакології та ботаніки, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0003-2860-0967](https://orcid.org/0000-0003-2860-0967)

Шевченко І. М., канд. фарм. наук, доцент каф. фармакогнозії, фармакології та ботаніки, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0002-5985-5092](https://orcid.org/0000-0002-5985-5092)

Фуклева Л. А., канд. фарм. наук, старший викладач каф. управління і економіки фармації та фармацевтичної технології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0002-2930-0619](https://orcid.org/0000-0002-2930-0619)

## Information about authors:

Grechana O. V., PhD, Associate Professor of the Department of Pharmacognosy, Pharmacology and Botany, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Serbin A. H., PhD, DSc, Professor of the Department of Pharmacy, Sumy National Agrarian University, Ukraine.

Salii O. O., PhD, Associate Professor of the Department of Industrial Pharmacy, Kyiv National University of Technologies and Design, Ukraine.

Rudnyk A. M., PhD, Associate Professor of the Department of Pharmacognosy, Pharmacology and Botany, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Shevchenko I. M., PhD, Associate Professor of the Department of Pharmacognosy, Pharmacology and Botany, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Fukleva L. A., PhD, Associate Professor of the Department of Management and Economics of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

## Список літератури

- Endress P. K. The morphological relationship between carpels and ovules in angiosperms: pitfalls of morphological interpretation. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2019. Vol. 189, Iss. 3. P. 201-227. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boy083>
- Кокар Н. *Таємничий Світ Рослин*. Тернопіль: Астон, 2020. 240 с.
- Мінарченко В. М. Лікарські рослини України. *Енциклопедія Сучасної України* / І. М. Дзюба, А. І. Жуковський, М. Г. Желєзняк та ін. Київ: Інститут енциклопедичних досліджень НАН України, 2016. URL: [https://esu.com.ua/search\\_articles.php?id=55467](https://esu.com.ua/search_articles.php?id=55467)
- Genetic Diversity and Intraspecific Relationships of *Trifolium fragiferum* L. in Iran / M. Haerinasab, F. Ali-Farsangi, F. Bordbar, A. Eslami Farouji. *Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A: Science*. 2020. Vol. 44, Iss. 2. P. 345-354. <https://doi.org/10.1007/s40995-020-00834-2>
- Effect of Salinity on Growth, Ion Accumulation and Mineral Nutrition of Different Accessions of a Crop Wild Relative Legume Species / A. Jėkabsonė, U. Andersone-Ozola, A. Karlsons et al. *Trifolium fragiferum*. *Plants*. 2022. Vol. 11, Iss. 6. P. 797. <https://doi.org/10.3390/plants11060797>
- Taxonomic implications of seed morphology and storage proteins in three tribes of the subfamily Papilionoideae (Fabaceae) in Egypt / M. A. Aboulela, Z. A. El-Karemy, H. A. Hosni et al. *Phytotaxa*. 2021. Vol. 484, Iss. 1. P. 75-95. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.484.1.3>
- Belhouala K., Benarba B. Medicinal Plants Used by Traditional Healers in Algeria: A Multiregional Ethnobotanical Study. *Frontiers in pharmacology* 2021. Vol. 12. P. 760492. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.760492>
- Traditional Uses of Leguminosae among the Karen in Thailand / N. Sutjaritjai, P. Wangpakattananawong, H. Balslev, A. Inta. *Plants*. 2019. Vol. 8, Iss. 12. P. 600. <https://doi.org/10.3390/plants8120600>
- Ghosh D. Quality issues of herbal medicines: internal and external factors. *International Journal of Complementary & Alternative Medicine*. 2018. Vol. 11, Iss. 2. P. 67-69. <https://doi.org/10.15406/ijcam.2018.11.00350>
- Wäldchen J., Mäder P. Plant Species Identification Using Computer Vision Techniques: A Systematic Literature Review. *Archives of computational methods in engineering: state of the art reviews*. 2018. Vol. 25, Iss. 2. P. 507-543. <https://doi.org/10.1007/s11831-016-9206-z>
- Comparative analysis of qualitative anatomical characters of *Trifolium* L. (Fabaceae) and their taxonomic implications: Preliminary results / L. Zoric, L. Merkulov, J. Lukovic, P. Boza. *Plant Systematics and*

- Evolution*. 2012. Vol. 298, Iss. 1. P. 205-219. <https://doi.org/10.1007/s00606-011-0538-8>
- [12] Biologically active compounds from forage plants / A. Tava, E. Biazzi, D. Ronga et al. *Phytochemistry Reviews*. 2022. Vol. 21. P. 471-501. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09779-9>
- [13] Zeb A., Hussain A. Chemo-metric analysis of carotenoids, chlorophylls, and antioxidant activity of *Trifolium hybridum*. *Heliyon*. 2020. Vol. 6, Iss. 1. P. e03195. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03195>
- [14] Phenolic fractions from nine *Trifolium* species modulate the coagulant properties of blood plasma in vitro without cytotoxicity towards blood cells / J. Kolodziejczyk-Czepas, M. Sieradzka, B. Moniuszko-Szajwaj et al. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2018. Vol. 70, Iss. 3. P. 413-425. <https://doi.org/10.1111/jphp.12872>
- [15] Evaluation of stability, physicochemical and antioxidant properties of extracted chlorophyll from Persian clover (*Trifolium resupinatum* L.) / G. R. Mehdipoor Damiri, A. Motamedzadegan, R. Safari et al. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2021. Vol. 15, Iss. 1. P. 327-340. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00614-x>
- [16] Folk medicine in Düzce province (Turkey) / İ. Gürbüz, A. M. Gençler Özkan, G. Akaydin et al. *Turkish Journal of Botany*. 2019. Vol. 43, Iss. 6. P. 769-784. <https://doi.org/10.3906/bot-1905-13>
- [17] Some questions about *Teae folia* (*Thea sinensis* L. seu *Camellia sinensis* L. Kuntze) as a medicinal raw material / O. V. Grechana, A. G. Serbin, S. D. Trzhetsinskii et al. *Eurasian Journal of Biosciences*. 2020. Vol. 14, N 2. P. 2569-2575.
- [18] Editorial: Linking Stomatal Development and Physiology: From Stomatal Models to Non-model Species and Crops / S. McAdam, C. Chater, E. D. Shpak et al. *Frontiers in plant science*. 2021. Vol. 12. P. 743964. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.743964>
- [19] Мікроморфологічні ознаки (Анатомічна структура листків та стебел, ультраструктура насінин) *Sempervivum globiferum* L. / П. М. Воробей, О. А. Футорна, І. Г. Ольшанський та ін. *Екологічні науки*. 2020. № 1. С. 316-323. <https://doi.org/10.32846/2306-9716/2020.eco.1-28.51>
- [20] Кириленко Н. А. Анатомо-морфологічні особливості вегетативних органів сукулентних рослин у зв'язку з умовами зростання. *Український екологічний журнал*. 2018. Т. 8, № 1. С. 509-515. [https://doi.org/10.15421/2018\\_243](https://doi.org/10.15421/2018_243)
- References**
- [1] Endress, P. K. (2019). The morphological relationship between carpels and ovules in angiosperms: pitfalls of morphological interpretation. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 189(3), 201-227. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boy083>
- [2] Кокар, Н. (2020). *Taiemnychiy svit Roslyn* [The mysterious world of plants]. Aston. [in Ukrainian].
- [3] Minarchenko, V. M. (2016). Likarski roslyny Ukrainy [Medicinal plants of Ukraine] In *Entsiklopediia Suchasnoi Ukrainy*. Kyiv: Institut entsiklopedichnikh doslidzhen NAN Ukrainy. [in Ukrainian]. [https://esu.com.ua/search\\_articles.php?id=55467](https://esu.com.ua/search_articles.php?id=55467)
- [4] Haerinasab, M., Ali-Farsangi, F., Bordbar, F., & Eslami Farouji, A. (2020). Genetic Diversity and Intraspecific Relationships of *Trifolium fragiferum* L. in Iran. *Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A: Science*, 44(2), 345-354. <https://doi.org/10.1007/s40995-020-00834-2>
- [5] Jėkabsonė, A., Andersone-Ozola, U., Karlsons, A., Romanovs, M., & Levinsh, G. (2022). Effect of Salinity on Growth, Ion Accumulation and Mineral Nutrition of Different Accessions of a Crop Wild Relative Legume Species, *Trifolium fragiferum*. *Plants*, 11(6), 797. <https://doi.org/10.3390/plants11060797>
- [6] Aboulela, M. A., El-Karemy, Z. A., Hosni, H. A., Saleh, S. M., & Faried, A. M. (2021). Taxonomic implications of seed morphology and storage proteins in three tribes of the subfamily Papilionoideae (Fabaceae) in Egypt. *Phytotaxa*, 484(1), 75-95. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.484.1.3>
- [7] Belhouala, K., & Benarba, B. (2021). Medicinal Plants Used by Traditional Healers in Algeria: A Multiregional Ethnobotanical Study. *Frontiers in pharmacology*, 12, 760492. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.760492>
- [8] Sutjaritjai, N., Wangpakattananawong, P., Balslev, H., & Inta, A. (2019). Traditional Uses of Leguminosae among the Karen in Thailand. *Plants*, 8(12), 600. <https://doi.org/10.3390/plants8120600>
- [9] Ghosh, D. (2018). Quality issues of herbal medicines: internal and external factors. *International Journal of Complementary & Alternative Medicine*, 11(2), 67-69. <https://doi.org/10.15406/ijcam.2018.11.00350>
- [10] Wäldchen, J., & Mäder, P. (2018). Plant Species Identification Using Computer Vision Techniques: A Systematic Literature Review. *Archives of computational methods in engineering : state of the art reviews*, 25(2), 507-543. <https://doi.org/10.1007/s11831-016-9206-z>
- [11] Zoric, L., Merkulov, L., Lukovic, J., & Boza, P. (2012). Comparative analysis of qualitative anatomical characters of *Trifolium* L. (Fabaceae) and their taxonomic implications: Preliminary results. *Plant Systematics and Evolution*, 298(1), 205-219. <https://doi.org/10.1007/s00606-011-0538-8>
- [12] Tava, A., Biazzi, E., Ronga, D., Pecetti, L., & Avato, P. (2022). Biologically active compounds from forage plants. *Phytochemistry Reviews*, 21, 471-501. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09779-9>
- [13] Zeb, A., & Hussain, A. (2020). Chemo-metric analysis of carotenoids, chlorophylls, and antioxidant activity of *Trifolium hybridum*. *Heliyon*, 6(1), e03195. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03195>
- [14] Kolodziejczyk-Czepas, J., Sieradzka, M., Moniuszko-Szajwaj, B., Nowak, P., Oleszek, W., & Stochmal, A. (2018). Phenolic fractions from nine *Trifolium* species modulate the coagulant properties of blood plasma in vitro without cytotoxicity towards blood cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70(3), 413-425. <https://doi.org/10.1111/jphp.12872>
- [15] Mehdipoor Damiri, G. R., Motamedzadegan, A., Safari, R., Shahidi, S. A., & Ghorbani, A. (2021). Evaluation of stability, physicochemical and antioxidant properties of extracted chlorophyll from Persian clover (*Trifolium resupinatum* L.). *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(1), 327-340. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00614-x>
- [16] Gürbüz, İ., Gençler Özkan, A. M., Akaydin, G., Salihoğlu, E., Günbatan, T., Demirci, F., & Yesilada, E. (2019). Folk medicine in Düzce province (Turkey). *Turkish Journal of Botany*, 43(6), 769-784. <https://doi.org/10.3906/bot-1905-13>
- [17] Grechana, O. V., Serbin, A. G., Trshchinskii, S. D., Panasenko, O. I., Klimenko, L. Yu., Oproshanska, T. V., Salyi, O. O. Some questions about *Teae folia* (*Thea sinensis* L. seu *Camellia sinensis* L. Kuntze) as a medicinal raw material. *Eurasian Journal of Biosciences*. 2020. Vol. 14, N 2. P. 2569-2575.
- [18] McAdam, S., Chater, C., Shpak, E. D., Raissig, M. T., & Dow, G. J. (2021). Editorial: Linking Stomatal Development and Physiology: From Stomatal Models to Non-model Species and Crops. *Frontiers in plant science*, 12, 743964. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.743964>
- [19] Vorobej, P., Futorna, O., Olshanskyy, I., Zhygalova, S., & Bezsmertna, O. (2020). Mikromorfolohichni oznaky (Anatomichna struktura lystkiv ta stebel, ultrastruktura nasynyn) [Mikromorphological study (anatomical structure of lamina surface, ultrastructure of seeds) of *Sempervivum globiferum* L.]. *Ekolohichni nauky*, (1), 316-323. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.32846/2306-9716/2020.eco.1-28.51>
- [20] Kirilenko, N. A. Anatomical and morphological features of the vegetative organs of succulent plants regards growth conditions. *Ukrainian Journal of Ecology*, 2018, 8(1), 509-515. [https://doi.org/10.15421/2018\\_243](https://doi.org/10.15421/2018_243)



# Chromato-mass spectroscopy of tinctures from the underground part of Valerian plants growing in Zaporizhzhia region

V. M. Odyntsova <sup>ID</sup>\*E,F, Yu. I. Korniiievskiy <sup>ID</sup>A,D, D. Yu. Skoryna <sup>ID</sup>B,C, V. H. Korniiievskaya <sup>ID</sup>B,D

Zaporizhzhia State Medical 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

Modern sedatives used in medical practice can be of both synthetic and natural origin. It is known that the best phytosedative is valerian. In the 18<sup>th</sup> century, valerian was included in all European pharmacopeias. High efficiency, good tolerability, and virtually no side effects ensure the widespread use of valerian and its phytopreparations in medical practice, especially for the treatment of geriatric patients. Despite this, valerian remains understudied due to its extreme polymorphism.

**The aim of the work** is to determine the component composition of valerian tinctures made from rhizomes with valerian roots of different species growing in the Zaporizhzhia region by gas chromatography and to carry out their comparative analysis.

**Materials and methods.** Samples of rhizomes with valerian roots made from medicinal plant raw materials of valerian according to the traditional production recipe (Tinctura Rhizomata cum radicibus Valerianae (1:5)) from different species of valerian growing in the Zaporizhzhia region were selected for experimental studies: *Valeriana stolonifera* Czern. – Kantserivska Balka, Zaporizhzhia district, Zaporizhzhia region; *V. exaltata* Mikan. – Shyroke village, Vasylyivskiy district, Zaporizhzhia region; *V. tuberosa* L. – Khortytsia Island, Zaporizhzhia; *V. collina* Wallr. – right bank of the Dnieper River, Zaporizhzhia. The component composition of valerian tinctures was studied using an Agilent 7890B gas chromatograph with a mass spectrometric detector 5977B.

**Results.** The component composition of tinctures from the underground part of valerian plants growing in the Zaporizhzhia region was identified and analyzed with chromato-mass spectrometry.

**Conclusions.** 55 components in valerian tincture from underground raw materials of *Valeriana stolonifera* Czern. were identified with gas chromatography: *V. exaltata* Mikan. – 48, *V. tuberosa* L. – 54, *V. collina* Wallr. – 51. Analyzing the obtained data, we can conclude that valerian tinctures differ in both quantitative and qualitative composition. Only compounds 7 and 9 coincide in tinctures from underground parts of all four types of valerian. Since the tinctures were made following the standard technology, the content of components in medicinal plant raw materials depends on the type, place of growth, environmental conditions, time of collection, drying of raw materials. The results of the study confirm the prospects of using the underground part of the studied plants of the genus Valerian to create new drugs and phytopreparations on their basis. However, given the extreme polymorphism of valerian for the introduction into the culture of promising species that grow in Ukraine, it is necessary to conduct more in-depth pharmacognostic and pharmacological studies of plants of this genus.

**Key words:** valerian tincture, gas chromatography, chromato-mass spectroscopy, component composition, quantitative content.

**Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 250–258**

## Хромато-мас-спектроскопія настоек із підземної частини рослин роду валеріана, що зростають у Запорізькому краї

В. М. Одинцова, Ю. І. Корнієвський, Д. Ю. Скорина, В. Г. Корнієвська

З-поміж сучасних седативних засобів, що використовують у медичній практиці, розрізняють препарати синтетичного та природного походження. Відомо, що кращим рослинним фітотранквілізатором є валеріана. У XVIII столітті валеріана була включена в усі європейські фармакопеї. Висока ефективність, хороша переносність і майже повна відсутність побічних ефектів забезпечують широке використання валеріани та її фітопрепаратів у медичній практиці, особливо для лікування геріатричних хворих. Незважаючи на це, валеріана лікарська залишається недостатньо вивченою через її надзвичайну поліморфність.

**Мета роботи** – методом газової хроматографії визначити компонентний склад настоек валеріани, виготовлених із кореневищ з коренями валеріани різних видів, які зростають у Запорізькому краї, та здійснити їх порівняльний аналіз.

**Матеріали та методи.** Для експериментальних досліджень обрали зразки настоек кореневищ із коренями валеріани, виготовлені з лікарської рослинної сировини валеріани за традиційною виробничою рецептурою (Tinctura Rhizomata cum radicibus Valerianae (1:5)) із різних видів валеріани, що зростають у Запорізькому краї: *Valeriana stolonifera* Czern. – Канцерівська балка, Запорізький район Запорізької області; *V. exaltata* Mikan. – с. Широке, Василівського району Запорізької обл.; *V. tuberosa* L. – о. Хортиця,

### ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/261819>

UDC 615.451.1:615.322:582.971.3].074:543.51

DOI: [10.14739/2409-2932.2022.3.261819](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2022.3.261819)

**Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 250–258**

**Key words:** valerian tincture, gas chromatography, chromato-mass spectroscopy, component composition, quantitative content.

\*E-mail: [odyntsova1505@gmail.com](mailto:odyntsova1505@gmail.com)

Received: 20.06.2022 // Revised: 05.07.2022 // Accepted: 20.07.2022



м. Запоріжжя; *V. collina* Wallr. – правий берег р. Дніпро, м. Запоріжжя. Компонентний склад настоек валеріани досліджували за допомогою газового хроматографа Agilent 7890B з мас-спектрометричним детектором 5977B.

**Результати.** За допомогою хромато-мас-спектрометрії ідентифікували та проаналізували компонентний склад настоек із підземної частини рослин роду валеріана, що зростають у Запорізькому краї.

**Висновки.** Методом газової хроматографії у настойці валеріани з підземної сировини *Valeriana stolonifera* Czern. Ідентифікували 55 компонентів, з *V. exaltata* Mikan. – 48, з *V. tuberosa* L. – 54, з *V. collina* Wallr. – 51. Проаналізувавши одержані дані, зробили висновок, що настойки валеріани відрізняються і за кількісним, і за якісним складом. У настойках з підземних органів усіх чотирьох видів валеріани збігаються лише сполуки 7 і 9. Оскільки настойки виготовлені за стандартною технологією, вміст компонентів у лікарській рослинній сировині залежить від виду, місця зростання, екологічних умов, часу збирання, сушіння сировини. Результати дослідження підтверджують перспективність використання підземної частини досліджених рослин роду валеріана для створення на їхній основі нових лікарських засобів і фітопрепаратів. Враховуючи надзвичайну поліморфність валеріани, для введення в культуру перспективних видів, які зростають на території України, необхідно здійснювати глибші фармакогностичні та фармакологічні дослідження рослин цього роду.

**Ключові слова:** настойка валеріани, газова хроматографія, хромато-мас-спектроскопія, компонентний склад, кількісний вміст.

**Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2022. Т. 15, № 3(40). С. 250–258**

Valerian has long been used in scientific and traditional medicine both independently (in the form of tinctures, decoctions and alcohol tinctures of fresh phytomass or air-dried raw materials, thick extract, fresh juice, powder of underground organs) and as part of various multicomponent phytocompositions, which allows varying their composition and, thus, intensively affect various parts of pathological disorders in the body [2].

Valerian grows all over the globe and has more than 250 species. In Ukraine, 13 species belong to the collective species cycle *Valeriana officinalis* L. s. l. of these, the most important are: *Valeriana grossheimii* Worosch., *V. sambucifolia* Mikan, *V. collina* Wallr., *V. simplicifolia* Kabath., *V. tripteris* L., *V. transylvanica* Schur, *V. exaltata* Mikan, *V. rossica* P. Smirn., *V. tanaitica* Worosch., *V. nitida* Kr., *V. stolonifera* Czern. The next plants grow in the Zaporizhzhia region: *V. stolonifera* Czern., *V. exaltata* Mikan, *V. collina* Wallr., *V. tuberosa* L. [1,3,4,6–12].

## Aim

The aim of the work is to determine the component composition of valerian tinctures made from rhizomes with valerian roots of different species growing in the Zaporizhzhia region by gas chromatography and to carry out their comparative analysis.

## Materials and methods

Samples of rhizomes with valerian roots made from medicinal plant raw materials of valerian according to the traditional production recipe (Tinctura Rhizomata cum radicibus Valerianae (1:5)) from different species of valerian growing in the Zaporizhzhia region were selected for experimental studies:

- *Valerian stolonifera* Czern. – Kantserivska Balka, Zaporizhzhia district, Zaporizhzhia region;
- *V. exaltata* Mikan. – Shyroke village, Vasylyvskiy district, Zaporizhzhia region;
- *V. tuberosa* L. – Khorlytsia Island, Zaporizhzhia;
- *V. collina* Wallr. – right bank of the Dnieper River, Zaporizhzhia.

The component composition of valerian tinctures was studied using an Agilent 7890B gas chromatograph with a mass spectrometric detector 5977B. Chromatography conditions: DB-5ms column 30 m long, with an inner diameter of 250 μm

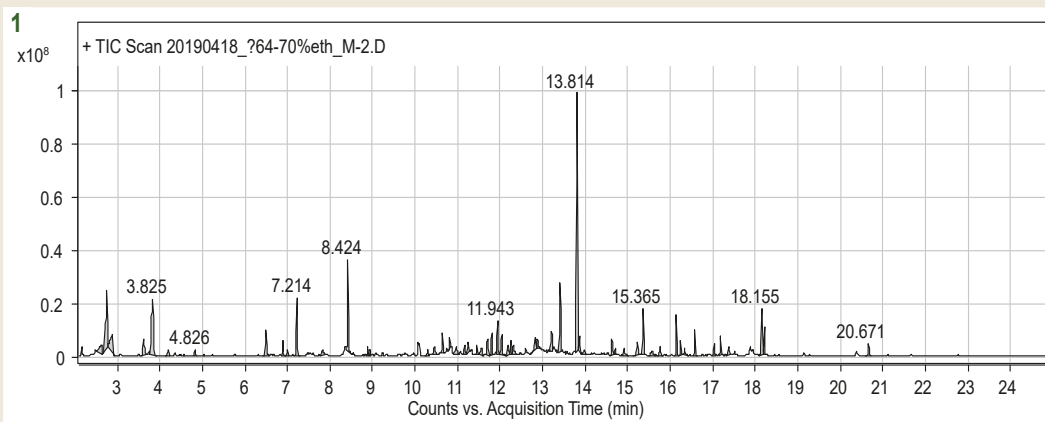
and a phase thickness of 0.25 μm. The speed of the carrier gas (helium) – 1.3 ml/min. The injection volume is 0.5 μl. The division of the flow is 1:5. The temperature of the sample injection unit – 265 °C. Thermostat temperature: programmable – 70 °C (exposure 1 min), up to 150 °C at a speed of 20 °/min (exposure 1 min), up to 270 °C at a speed of 20 °/min (exposure 4 min). The NIST 14 mass spectrum library was used to identify the components.

## Results

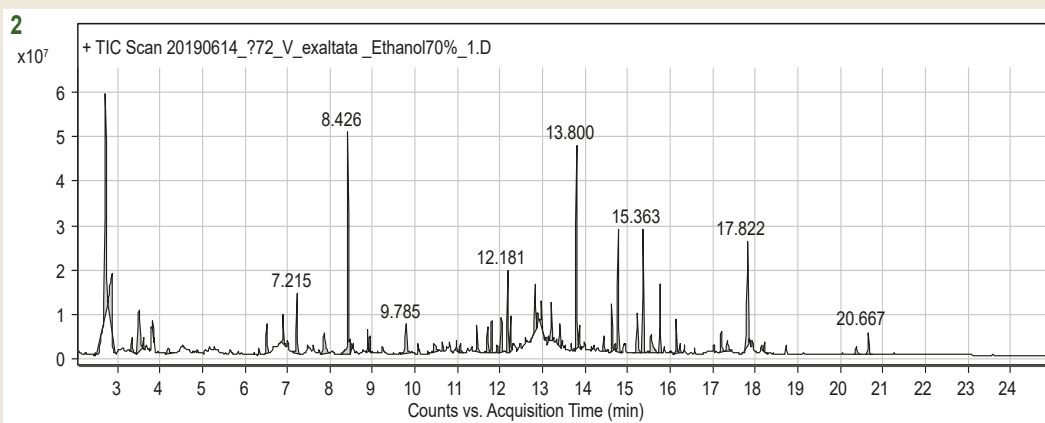
The component composition of tinctures from the underground part of Valerian plants growing in the Zaporizhzhia region was identified and analyzed with chromat-mass spectrometry. 153 components were identified in the analysis of chromatograms (Fig. 1–4, Table 1) of the valerian tinctures (Table 1) belonging to different classes of biologically active compounds.

In the tincture of valerian from *Valeriana stolonifera* Czern. (Kantserivska Balka) 55 compounds were identified, of which 9 components are quantitatively distinguished in terms of peak areas and retention time: 13.814 RT (*E*)-3-((4*S*,7*R*,7*aR*)-3,7-Dimethyl-2,4,5,6,7,7*a*-hexahydro-1*H*-inden-4-yl)-2-methylacrylaldehyde – 18.21 %; 3.825 RT 7,7-Dimethyl-2-methylidenebicyclo[2.2.1]heptane – 7.25 %; 8.424 RT [(1*S*,2*R*,4*S*)-1,7,7-Trimethyl-2-bicyclo[2.2.1]heptanyl] acetate – 5.26 %; 18.155 RT Ethyl linoleate – 3.35 %; 7.214 RT (6,6-Dimethyl-2-bicyclo[3.1.1]hept-2-enyl)methanol – 3.29 %; 15.365 RT [(1*S*,2*R*,5*R*,6*R*,8*S*,12*S*)-1,5,9,9-Tetramethyl-10-oxatricyclo[6.2.2.0<sup>2,6</sup>]dodecan-12-yl] acetate – 2.75 %; 11.943 RT Myrtenyl isovalerate – 2.04%; 20.671 RT 6-Isopropenyl-4,8*a*-dimethyl-1,2,3,5,6,7,8,8*a*-octahydronaphthalene-2,3-diol – 0.93 %; 4.826 RT *D*-Limonene – 0.37 %.

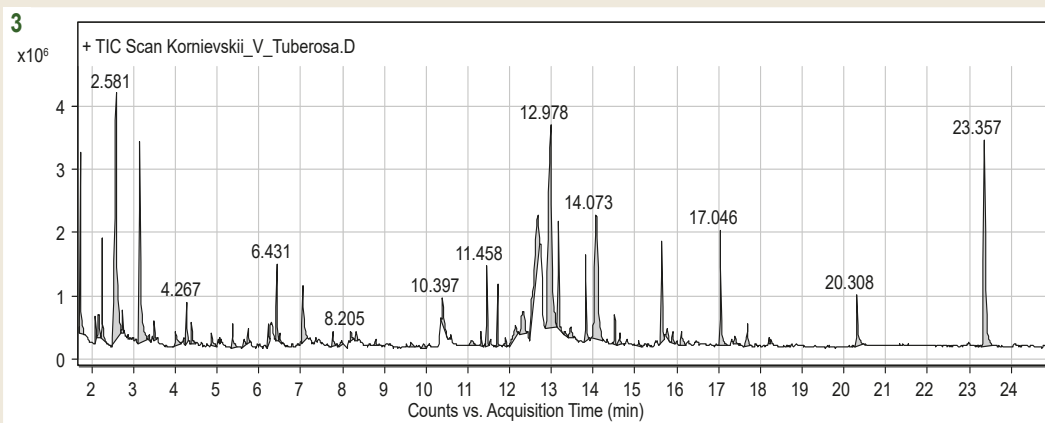
In the tincture of *V. exaltata* Mikan. (Shyroke village, Vasylyvskiy district, Zaporizhzhia region) 48 components were identified, of which 8 components are quantitatively distinguished in terms of peak areas and retention time: 8.426 RT [(1*S*,2*R*,4*S*)-1,7,7-Trimethyl-2-bicyclo[2.2.1]heptanyl] acetate – 9.33 %; 13.80 RT (*E*)-3-((4*S*,7*R*,7*aR*)-3,7-Dimethyl-2,4,5,6,7,7*a*-hexahydro-1*H*-inden-4-yl)-2-methylacrylaldehyde – 7.72 %; 17.822 RT 11,14-Dihydroxy-2-methyltricyclo[8.4.0.0<sup>2,7</sup>]tetradec-6-en-5-one – 5.44 %; 15.363 RT [(1*S*,2*R*,5*R*,6*R*,8*S*,12*S*)-1,5,9,9-Tetramethyl-10-oxatricyclo[6.2.2.0<sup>2,6</sup>]dodecan-12-yl] acetate



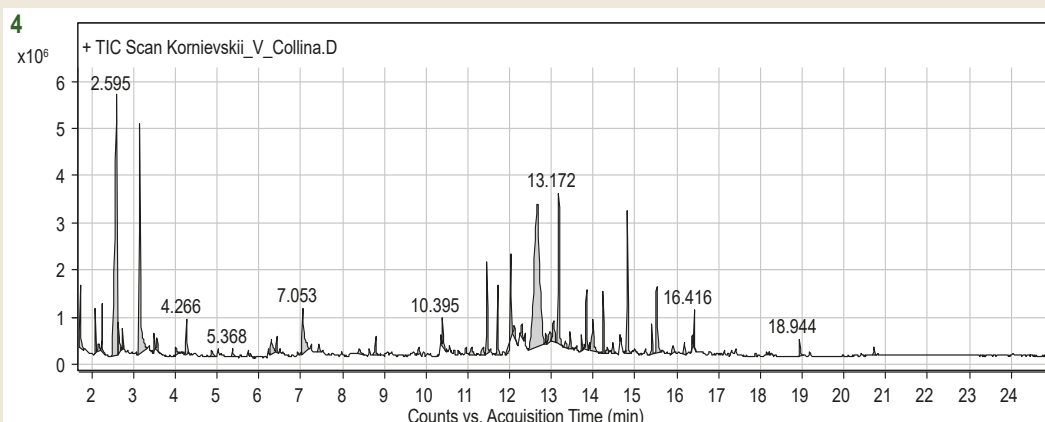
**Fig. 1.** Chromatogram of valerian tincture of *V. stolonifera* Czern.



**Fig. 2.** Chromatogram of valerian tincture of *V. exaltata* Mikan.



**Fig. 3.** Chromatogram of valerian tincture of *V. tuberosa* L.



**Fig. 4.** Chromatogram of valerian tincture of *V. collina* Wallr.

**Table 1.** Comparative characteristics of mass spectroscopy of tinctures from the underground part of Valerian plants growing in the Zaporizhzhia region

Sl. No.	Chemical name of the component	Molecular formula	<i>V. stolonifera</i>		<i>V. exaltata</i>		<i>V. tuberosa</i>		<i>V. collina</i>	
			Rt	Content, %	Rt	Content, %	Rt	Content, %	Rt	Content, %
1	1-Hydroxypropan-2-one	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>					1.732	2.70	1.731	1.50
2	2,2'-Bioxirane	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>							2.086	0.74
3	1,2,3,4-Diepoxybutane	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>					2.088	0.42		
4	Acetoxyacetic acid	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>							2.164	0.30
5	Methyl acetate	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>					2.166	0.84		
6	Methyl 2-oxopropanoate	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>			3.338	0.53	2.247	1.77	2.246	1.01
7	3-Methylbutanoic acid	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	2.625 2.877	1.53 2.39	2.862	4.12	2.581	13.37	2.595	17.64
8	2-Methylbutanoic acid	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>							2.627	1.10
9	Ethyl 3-methylbutanoate	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	2.75	7.05	2.72	14.71	2.733	0.30	2.734	0.36
10	Dihydroxyacetone	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>			3.504	4.09	3.144	7.09	3.145	8.66
11	3-Carene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>			3.607	0.39				
12	1,3,3-Trimethyltricyclo[2.2.1.0 <sup>2,6</sup> ]heptane	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	3.609	1.97						
13	2-[(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]propanoic acid	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>					3.375	0.20		
14	1,2-Cyclopentanedione	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>					3.5	0.42	3.497	0.53
15	3-Methylpentanoic acid	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>							3.56	0.37
16	7,7-Dimethyl-2-methylidenebicyclo[2.2.1]heptane	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	3.825	7.25						
17	(1S)-2,2-Dimethyl-3-methylenebicyclo[2.2.1]heptane	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>			3.826	0.44				
18	Glycerin	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>					4.006	0.64	4.018	0.36
19	β-Phellandrene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>			4.184	0.41				
20	6,6-Dimethyl-2-methylidenebicyclo[3.1.1]heptane	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	4.189	0.47						
21	2-Hydroxy-γ-butyrolactone	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>					4.267	0.82	4.266	0.90
22	Aminopyrazole	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> N <sub>3</sub>					4.387	0.57		
23	D-Limonene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	4.826	0.37						
24	N-(2-Fluorophenyl)-3-morpholin-4-ylpropanamide	C <sub>13</sub> H <sub>17</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>					4.872	0.37	4.872	0.32
25	Clindamycin	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S							5.368	0.33
26	Thymine	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>					5.371	0.65		
27	2-Methylhept-2-en-4-one	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O					5.642	0.23		
28	2-Nonen-1-ol	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O					5.739	0.32	-	-
29	N-Methoxycarbonyl-L-alanine nonyl ester	C <sub>14</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>4</sub>					6.228	0.29	-	-
30	D,L-Arabinose	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>							6.296 6.431	1.10 0.42
31	3,5-Dihydroxy-6-methyl-2,3-dihydropyran-4-one	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	6.493	1.83	6.506	1.23	6.431	1.47		
32	(2R)-1,7,7-Trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	6.891	0.80						
33	endo-Borneol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O			6.895	1.30				
34	4-Hydroxyoxolan-2-one	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>					6.496	0.23		
35	Terpinen-4-ol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	6.993	0.37						
36	(6,6-Dimethyl-2-bicyclo[3.1.1]hept-2-enyl)methanol	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	7.214	3.29						
37	Catechol	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>					7.053	1.92	7.053	2.47
38	(-)-Myrtenol	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O			7.215	2.08				

## Cont. of table 1.

Sl. No.	Chemical name of the component	Molecular formula	<i>V. stolonifera</i>		<i>V. exaltata</i>		<i>V. tuberosa</i>		<i>V. collina</i>	
			Rt	Content, %	Rt	Content, %	Rt	Content, %	Rt	Content, %
39	2,3-Dihydro-1-benzofuran	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O							7.43	0.35
40	2,3-Dihydroxypropyl acetate	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	7.819	0.88	7.864	1.85				
41	Hexyl 3-oxobutanoate	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>					7.764	0.43		
42	9-Oxabicyclo[3.3.1]nonan-2-yl acetate	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>					7.979	0.17		
43	Methyl 6-oxoheptanoate	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>					8.205	0.31		
44	Glucuronamide	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>6</sub>					8.326	0.26		
45	[(1S,2R,4S)-1,7,7-Trimethyl-2-bicyclo[2.2.1]heptanyl] acetate	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	8.424	5.26	8.426	9.33				
46	1-(2-Hydroxy-5-methylphenyl)ethanone	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>							8.791	0.71
47	(4- <i>tert</i> -Butylphenyl) 5-hydroxypentanoate	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>								
48	2-(2-Butynyl)cyclohexanone	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O					8.792	0.20		
49	1-(2,6,6-Trimethylcyclohexen-1-yl)ethanol	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O	8.882	0.44						
50	2-(3-Oxobutyl)cyclohexan-1-one	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>			8.882	0.74				
51	Myrtenyl acetate	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	8.932	0.39	8.933 11.935	0.64 0.45				
52	Phorone	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O					9.65	0.17		
53	5-Butyloxolan-2-one	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>			9.785	1.99				
54	Vanillin lactoside	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>13</sub>					9.931	0.18	9.821	0.24
55	Caryophyllene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	10.296	0.42						
56	1-Nitro-3-(propoxymethyl)benzene	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>							10.395	0.99
57	Inosine	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>					10.397	0.89%		
58	2,10,10-Trimethyltricyclo[7.1.1.0 <sup>2,7</sup> ]undec-7-en-6-one	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O	10.452	0.62						
59	(4 <i>R</i> ,4 <i>aR</i> )-1,1,4,7-Tetramethyl-1 <i>a</i> ,2,3,4,4 <i>a</i> ,5,6,7 <i>b</i> -octahydrocyclopropa[e]azulene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	10.648	1.39						
60	$\beta$ -Panasinene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	10.813	0.58						
61	( <i>E</i> )-4-(2,6,6-trimethylcyclohexen-1-yl)but-3-en-2-one	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O	10.969	1.04						
62	<i>trans</i> - $\beta$ -Ionone	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O			10.972	0.40				
63	6- <i>epi</i> -Shyobunol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O			11.059	0.37				
64	<i>D</i> -Mannose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>					11.093	0.37	8.396	0.36
65	2-Methyl-5-(6-methylhept-5-en-2-yl)cyclohexa-1,3-diene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	11.163	0.58						
66	(1 <i>S</i> ,2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> ,10 <i>R</i> )-3,7,11,11-Tetramethylbicyclo[8.1.0]undeca-2,6-diene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	11.251	0.59						
67	Octahydro-1 <i>H</i> -cyclopropa[c]inden-7-ol	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O					11.314	0.34		
68	Ethyl (4 <i>E</i> )-2-nitrodeca-4,9-dienoate	C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>							11.365	0.44
69	Acetylvanillin	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>							11.459	2.46
70	2-(Bromomethyl)adamantan-2-ol	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> BrO	11.455	0.82	11.457	1,27%	11.458	1.51%		
71	$\alpha$ -Panasinene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	11.557	0.70						
72	Kessane	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	11.706	1.63						
73	Pulegone	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O			11.709	1.48				

Cont. of table 1.

Sl. No.	Chemical name of the component	Molecular formula	<i>V. stolonifera</i>		<i>V. exaltata</i>		<i>V. tuberosa</i>		<i>V. collina</i>	
			Rt	Content, %	Rt	Content, %	Rt	Content, %	Rt	Content, %
74	3-Ethoxyphenylhydrazine	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O							11.712	2.22
75	(3-Ethoxyphenyl)hydrazide	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O					11.71	1.30		
76	Pacifgorgiol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	11.795	1.44	11.791	1.43				
77	13-Oxadispiro[5.0.5.1]tridecane	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O					11.9	0.18		
78	Myrtenyl acetate	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>			11.935	0.45				
79	Myrtenyl isovalerate	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	11.943	2.04						
80	4-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-3-oxocyclohexa-1,4-dienecarbaldehyde	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>							12.025	3.02
81	(7S)-4,4,7,9a-Tetramethyl-1,2,3,6,8,9-hexahydrobenzo[7]annulen-7-ol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	12.03	1.89	12.023	2.09				
82	Methyl β-D-glucopyranoside	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>							12.108	0.57
83	D-Mannopyranoside	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>					12.147	0.76		
84	(1aR,3aS,7S,7aR)-1,1,3a,7-Tetramethyl-decahydro-1H-cyclopropa[a]naphthalen-7-ol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	12.184	0.62	12.181	2.78				
85	(7S)-1,1,7-Trimethyl-4-methylidene-1a,2,3,4a,5,6,7a,7b-octahydrocyclopropa[h]azulen-7-ol	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	12.251	0.95	12.245	1.48				
86	3,4-Dihydroxy-5-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)oxolan-2-one	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>							12.292	0.50
87	Spirojatamol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	12.308 12.88	0.97 0.86						
88	3-Deoxy-D-mannonic lactone	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>					12.322	1.68		
89	Ethyl-α-D-glucopyranoside	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>							12.658	23.35
90	Ethyl hexopyranoside	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>					12.668	5.54		
91	Isospathulenol	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	12.818	0.89	12.817	1.76				
92	(-)-Spathulenol	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O							12.861	0.32
93	γ-Himachalene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>			12.881	0.51				
94	D,L-3-Camphorcarboxylic acid	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>			12.971	1.22				
95	[5,5-Dimethyl-6-(3-methyl-but-1,3-dienyl)-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-1-yl]-methanol	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>							12.96	0.70
96	Undefined structure component	-					12.978	15.80		
97	Methyl (5Z,8Z,11Z,14Z)-icosa-5,8,11,14-tetraenoate	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>							13.046	1.15
98	[Benzyl(dimethyl)silyl]furan-2-carboxylate	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub> Si	13.214	2.13			13.166	2.62		
99	tert-Butyl(dimethyl)silyl-2-furoate	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub> Si			13.21	1.82			13.172	5.95
100	L-Gala-l-ido-octonic lactone	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>					13.318	0.20		
101	N-[4-(3-hydroxypyrrolidin-1-yl)but-2-ynyl]-N-methylacetamide	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>							13.332	0.35%
102	(4aR,7S,8aS)-4a,8a-dimethyl-7-propan-2-yl-3,4,5,6,7,8-hexahydro-2H-naphthalen-1-one	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	13.407	4.72	13.402	0.87				
103	Patchouli alcohol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O							13.447	0.51
104	Methyl octadeca-2,5-dienoate	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>					13.457	0.41		
105	(E)-3-((4S,7R,7aR)-3,7-Dimethyl-2,4,5,6,7,7a-hexahydro-1H-inden-4-yl)-2-methylacrylaldehyde	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	13.814	18.21	13.80	7.72				
106	1-Hydroxy-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propan-2-one	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>					13.819	2.11		

## Cont. of table 1.

Sl. No.	Chemical name of the component	Molecular formula	<i>V. stolonifera</i>		<i>V. exaltata</i>		<i>V. tuberosa</i>		<i>V. collina</i>	
			Rt	Content, %	Rt	Content, %	Rt	Content, %	Rt	Content, %
107	(E)-3-(3,7-dimethyl-2,4,5,6,7,7a-hexahydro-1H-inden-4-yl)-2-methylprop-2-enal	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O							13.84	2.09
108	Valerenol	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	13.863	0.75	13.86	0.74				
109	(E)-4-(3-Hydroxyprop-1-en-1-yl)-2-methoxyphenol	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	13.978	0.42%					13.991	1.60
110	Bicyclopentyl-1'-en-1-ol	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O					14.073	9.22		
111	Corymbolone	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>							14.344	0.27
112	Isospathulenol	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O			14.436	0.56				
113	Drim-7-en-11-ol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O					14.513	0.69		
114	12-Hydroxy-14-methyl-oxa-cyclotetradec-6-en-2-one	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>					14.639	0.35		
115	Khusimyl methyl ether	C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> O	14.701	0.38						
116	$\alpha$ -Kessyl acetate	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>			14.773	4.51			13.725 14.817 15.406	0.46 3.78 0.84
117	Isospathulenol	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O							14.474	0.30
118	<i>trans</i> -Valerenyl acetate	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	14.909	0.46%						
119	2,5,5,8a-Tetramethyl-4-methylene-6,7,8,8a-tetrahydro-4H,5H-chromen-4a-yl-hydroperoxide	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>					15.083	0.17		
120	Valerenic acid	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	15.23	1.13	15.23	2.01				
121	[(1S,2R,5R,6R,8S,12S)-1,5,9,9-Tetramethyl-10-oxatricyclo[6.2.2.0 <sup>2,6</sup> ]dodecan-12-yl] acetate	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	15.365	2.75	15.363	4.38			14.244	1.69
122	Ethyl 14-oxotetradecanoate	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	15.581	0.59						
123	(E)-8-Methyl-9-tetradecen-1-ol acetate	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>			15.555	1.64				
124	3,5-Dihydroxy-5',7-dimethyl-2'-propan-2-yl-spiro[8,10-dioxatricyclo[5.4.0.0 <sup>2,6</sup> ]undecane-9,1'-cyclohexane]-11-one	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>							15.519	2.92
125	[(2E)-Dodeca-2,11-dien-4-yl] acetate	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>					15.64	2.56		
126	(8S,14)-Cedran-diol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	14.633 15.763 17.028	1.22 0.70 0.72	14.629 15.762	1.75 2.48				
127	Methyl 11,13-dihydroxytetradec-5-ynoate	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>					15.764	0.27		
128	12-Hydroxy-14-methyl-oxa-cyclotetradec-6-en-2-one	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>					15.899	0.43		
129	Ethyl (2E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoate	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>							15.904	0.45
130	2-Dodec-7-ynoxyoxane	C <sub>17</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>					16.107	0.71		
131	[4-Methoxy-2-(3-methyloxiran-2-yl)phenyl] 2-methylbutanoate	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	16.146	2.32	16.141	1.45				
132	3-Hydroxy-1a,3,6,6-tetramethylhexahydro-2-oxa-cyclopropa[d]naphthalen-5-one	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>							16.177	0.39
133	Hexadecanoic acid	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	16.248	0.98	16.231	0.42				
134	(2R,3R,4aR,5S,8aS)-2-Hydroxy-4a,5-dimethyl-3-(prop-1-en-2-yl)octahydronaphthalen-1(2H)-one	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	16.338	0.51					16.375	0.29
135	4,8a-Dimethyl-6-prop-1-en-2-yl-2,3,4,4a,5,6,7,8-octahydronaphthalen-1-one	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O							16.416	1.19
136	Ethyl hexadecanoate	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	16.579	1.93						
137	Undefined structure component	–					17.046	3.32		

Cont. of table 1.

Sl. No.	Chemical name of the component	Molecular formula	<i>V. stolonifera</i>		<i>V. exaltata</i>		<i>V. tuberosa</i>		<i>V. collina</i>	
			Rt	Content, %	Rt	Content, %	Rt	Content, %	Rt	Content, %
138	( <i>E</i> )-Valerenyl isovalerate	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	17.182	1.40						
139	5,8-Dihydroxy-4 <i>a</i> -methyl-4 <i>a</i> ,4 <i>b</i> ,5,6,7,8,8 <i>a</i> ,9,10-decahydro-2(3 <i>H</i> )-phenanthrene	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>			17.201	1.28				
140	6-(4-Hydroxy-2-methylbutan-2-yl)-2,3-dimethylphenol	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>			17.342	0.70				
141	4,8 <i>a</i> -Dimethyl-6-prop-1-en-2-yl-2,3,4,4 <i>a</i> ,5,6,7,8-octahydronaphthalen-1-one	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	17.371	0.59						
142	2,5,5,8 <i>a</i> -Tetramethyl-6,7,8,8 <i>a</i> -tetrahydro-5 <i>H</i> -chromen-8-ol	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>					17.396	0.23		
143	11,13-Dihydroxy-tetradec-5-ynoic acid	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>					17.689	0.84		
144	11,14-Dihydroxy-2-methyltricyclo[8.4.0.0 <sup>2,7</sup> ]tetradec-6-en-5-one	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>			17.822	5.44				
145	Ethyl linoleate	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	18.155	3.35						
146	Ethyl (9 <i>Z</i> ,12 <i>Z</i> ,15 <i>Z</i> )-octadeca-9,12,15-trienoate	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	18.21	1.55						
147	Desacetylanguidine	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>			18.21	0.44				
148	[( <i>E</i> )-2-(2,2,6-Trimethyl-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-1-yl)prop-1-enyl] acetate	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>							18.944	0.63
149	(5,9-Diacetyloxycyclododecyl) acetate	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>					20.308	2.04		
150	(+)-Longicamphenylone	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O			20.375	0.44				
151	6-Isopropenyl-4,8 <i>a</i> -dimethyl-1,2,3,5,6,7,8,8 <i>a</i> -octahydronaphthalene-2,3-diol	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	20.671	0.93	20.667	1.09				
152	3,5- <i>Bis</i> -(2,5-dimethylphenyl)-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -inden-1-one	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O					23.357	9.09		
153	6-Isopropenyl-4,8 <i>a</i> -dimethyl-1,2,3,5,6,7,8,8 <i>a</i> -octahydronaphthalene-2,3-diol	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>							20.714	0.32

–4.38 %; 12.181 RT (1*aR*,3*aS*,7*S*,7*aS*,7*bR*)-1,1,3*a*,7-Tetramethyl-decahydro-1*H*-cyclopropa[*a*]naphthalen-7-ol – 2.78 %; 7.215 RT (–)-Myrtenol – 2.08 %; 9.785 RT 5-Butyloxolan-2-one – 1.99 %; 20.667 RT 6-Isopropenyl-4,8*a*-dimethyl-1,2,3,5,6,7,8,8*a*-octahydronaphthalene-2,3-diol – 1.09 %.

In the comparative characterization of tinctures of *V. stolonifera* and *V. exaltata* it was found that 4 components coincide: 13.80–13.814 RT 7.72–18.21 %; 3.825–8.426 RT 7.25–9.33 %; 15.363–15.365 RT 2.75–4.38 %; 20.667–20.671 RT 0.37–1.09 %.

Analyzing the retention time and peak areas (Fig. 3) of valerian tincture of *V. tuberosa* L. (Khortytisia Island) 54 components were identified, of which 11 components are quantitatively distinguished in terms of peak areas and retention time: 2.581 RT 3-Methylbutanoic acid – 13.37 %; 14.073 RT Bicyclopentyl-1'-en-1-ol – 9.22 %; 23.357 RT 3,5-*Bis*-(2,5-dimethylphenyl)-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one – 9.09 %; 20.308 RT (5,9-Diacetyloxycyclododecyl) acetate – 2.04 %; 11.458 RT 2-(Bromomethyl)adamantan-2-ol – 1.51 %; 6.431 RT 3,5-Dihydroxy-6-methyl-2,3-dihydropyran-4-one – 1.47 %; 10.397 RT Inosine – 0.89 %; 4.267 RT 2-Hydroxy- $\gamma$ -butyrolactone – 0.82 %; 8.205 RT Methyl 6-oxoheptanoate – 0.31 %; two components of undefined structure (12.978 RT – 15.8 %; 17.046 RT – 3.32 %).

During the study of tincture of *V. collina* Wallr. (right bank of the Dnieper River, Zaporizhzhia) 51 components were identified, of which 8 components are quantitatively distinguished in terms of peak areas and retention time: 2.595 RT 3-Methylbutanoic acid – 17.64 %; 13.172 RT *tert*-Butyl(dimethyl)silyl-2-furoate – 5.95 %; 7.053 RT Catechol – 2.47 %; 16.416 RT 4,8*a*-Dimethyl-6-prop-1-en-2-yl-2,3,4,4*a*,5,6,7,8-octahydronaphthalen-1-one – 1.19 %; 10.395 RT 1-Nitro-3-(propoxymethyl)benzene – 0.99 %; 4.266 RT 2-Hydroxy- $\gamma$ -butyrolactone – 0.90 %; 18.944 RT [(*E*)-2-(2,2,6-Trimethyl-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-1-yl)prop-1-enyl] acetate – 0.63 %; 5.368 RT Clindamycin – 0.33 %.

Carrying out a comparative characterization of tincture of *V. tuberosa* and *V. collina*, we can determine that only one component is the same – 2.581–2.595 RT 13.37–17.64 %.

## Discussion

Using chromat-mass spectrometry in tinctures from the underground part of Valerian plants growing in the Zaporizhzhia region, the component composition was identified and its quantitative assessment was carried out. In the tincture of *Valeriana stolonifera* Czern. (Kantserivska Balka) 55 compounds

were identified, of which 9 components are quantitatively distinguished in terms of peak areas and retention time. In the tincture of *V. exaltata* Mikan. (Shyroke village, Vasylyvskiy district, Zaporizhzhia region) 48 components were identified, of which 8 components are quantitatively distinguished in terms of peak areas and retention time. In the tincture of *V. tuberosa* L. (Khortytsia Island) 54 components were identified, of which 11 components are quantitatively distinguished in terms of peak areas and retention time. In the tincture of *V. collina* Wallr. (right bank of the Dnieper River, Zaporizhzhia) 51 components were identified, of which 8 components are quantitatively distinguished in terms of peak areas and retention time.

Note that during the analysis of 153 identified components of valerian tinctures from raw materials of different growth sites (Table 1), in all tinctures more than 50 compounds are present in the amount of more than 1 % (1, 6, 7, 9, 10, 12, 16, 31, 36, 37, 38, 40, 45, 53, 59, 61, 69, 70, 72, 73, 74, 75, 76, 79, 80, 84, 88, 89, 90, 91, 94, 97, 98, 99, 102, 105, 106, 107, 109, 110, 116, 120, 121, 123, 124, 125, 126, 131, 135, 136, 138, 139, 144, 145, 146, 149, 151, 152).

## Conclusions

1. 55 components were identified in valerian tincture from underground raw materials *Valeriana stolonifera* Czern. by gas chromatography; *V. exaltata* Mikan. – 48, *V. tuberosa* L. – 54, *V. collina* Wallr. – 51.

2. Analyzing the obtained data, we can conclude that valerian tinctures differ in both quantitative and qualitative composition. Only compounds 7 and 9 coincide in tinctures from underground parts of all four types of valerian.

3. Since the tinctures were made following the standard technology, the content of components in medicinal plant raw materials depends on the type, place of growth, environmental conditions, time of collection, drying of raw materials.

4. The results of the study confirm the prospects of using the underground part of the studied plants of the genus Valerian to create new drugs and phytopreparations on their basis.

5. Given the extreme polymorphism of valerian for the introduction into the culture of promising species that grow in Ukraine, it is necessary to conduct more in-depth pharmacognostic and pharmacological studies of plants of this genus.

**Prospects for future studies.** The underground part of valerian can be used as an affordable and valuable medicinal plant raw material due to the content of numerous biologically active substances. It can be introduced into various phytotherapeutic prescriptions for the treatment of many diseases and the correction of pathological conditions. The results are the basis for the creation of new drugs and phytopreparations.

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

### Information about authors:

Odyntsova V. M., PhD, DSc, Professor of the Department of Pharmacognosy, Pharmacology and Botany, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.  
ORCID ID: [0000-0002-7883-8917](https://orcid.org/0000-0002-7883-8917)

Kornievskiy Yu. I., PhD, Associate Professor of the Department of Pharmacognosy, Pharmacology and Botany, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0001-7863-6736](https://orcid.org/0000-0001-7863-6736)

Skoryna D. Yu., PhD, Senior Lecturer of the Department of Pharmaceutical Chemistry, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0002-8851-8757](https://orcid.org/0000-0002-8851-8757)

Kornievskaya V. H., PhD, Associate Professor of the Department of Pharmacognosy, Pharmacology and Botany, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0001-8307-1282](https://orcid.org/0000-0001-8307-1282)

### Відомості про авторів:

Одинцова В. М., д-р фарм. наук, професор каф. фармакогнозії, фармакології та ботаніки, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Корнієвський Ю. І., канд. фарм. наук, доцент каф. фармакогнозії, фармакології та ботаніки, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Скорина Д. Ю., канд. фарм. наук, старший викладач каф. фармацевтичної хімії, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Корнієвська В. Г., канд. фарм. наук, доцент каф. фармакогнозії, фармакології та ботаніки, Запорізький державний медичний університет, Україна.

### References

- [1] State Enterprise Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center of Medicines Quality. (2014). *Derzhavna Farmakopeia Ukrainy* [The State Pharmacopoeia of Ukraine] (2nd ed.). Kharkiv: State Enterprise Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center of Medicines Quality. [in Ukrainian].
- [2] Kornievskiy, Yu. I., Kornievskaya, V. H., Panchenko, S. V., & Bohuslavskaya, N. Yu. (2014). *Valeriana likarska*. [Valerian Medicines]. Zaporizhzhia : ZSMU. [in Ukrainian].
- [3] Kornievskiy, Yu. I. Odyntsova, V. M. Kornievskaya, V. H. Kandybei, N. V. & Bohuslavskaya, N. Yu. (2019). *Tekhnolohiia vyrobnytstva ta khromato-mas-spektroskopii nastoiok valeriany likarskoi* [Production technology and chromat-mass spectroscopy of the valeriana officinalis tinctures]. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*, 12(2), 172-180. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2019.2.171002>
- [4] Ministry of Health of Ukraine. (2017). *Tekhnolohichniy rehlyment TP 64-01973472-069-17 na vyrobnytstvo likarskoho zasobu "Valeriany nastoika, nastoika po 25 ml u flakonakh v pachtsi abo bez pachky"* [Valerian tincture, tincture of 25 ml in vials in a pack or without a pack]. Zaporizhzhia: Viola. [in Ukrainian].
- [5] Kryvenko, V. I., Kornievskiy, Yu. I., Kolesnyk, M. Yu., Kornievskaya, V. H., & Demchenko, A. V. (2018). *Fitoterapiia insomniia* [Phytotherapy of insomnia]. Zaporizhzhia: ZSMU. [in Ukrainian].
- [6] Upton, R., & Petrone, C. (Eds.). (1999). *Valerian Root*. American Herbal Pharmacopoeia and Therapeutic Compendium. Santa Cruz.
- [7] Bos, R., Hendriks, H., Pras, N., St. Stojanova, A., & Georgiev, E. V. (2000). Essential oil composition of valeriana officinalis ssp. Collina cultivated in Bulgaria. *Journal of Essential Oil Research*, 12(3), 313-316. <https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9699524>
- [8] ESCOP. (2003). *Monographs* (pp. 539-546). Thieme.
- [9] Council of Europe. (2005). *European Pharmacopoeia* (Vol. 2, 5th ed.), (pp. 2667-2668). Strasbourg.
- [10] Pavlovic, M., Kovacevic, N., Tzakou, O., & Couladis, M. (2004). The essential oil of valeriana officinalis l. s.l. growing wild in western serbia. *Journal of Essential Oil Research*, 16(5), 397-399. <https://doi.org/10.1080/10412905.2004.9698753>
- [11] Raal, A., Orav, A., Arak, E., Kailas, T., & Müürisepp, M. (2007). Variation in the composition of the essential oil of Valeriana officinalis L. roots from Estonia. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences: Chemistry*, 56(2), 67-74.
- [12] World Health Organization. (1999). *Monographs on Selected Medicinal Plants* (Vol. 1, pp. 267-276). WHO.





# Розробка та валідація методики визначення супровідних домішок у гранулах для оральної суспензії з німесулідом

К. В. Тарапон<sup>ID</sup>\*A,B,D, О. В. Тригубчак<sup>ID</sup>C,E,F

АТ «Фармак», м. Київ, Україна

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

Один із ключових етапів фармацевтичної розробки – розроблення аналітичних методик для контролю якості лікарських засобів. Критичним показником якості є вміст супровідних домішок, що може збільшуватись у процесі зберігання препарату внаслідок розкладання діючої речовини, а це впливає на якість препарату.

**Мета роботи** – розробити та здійснити валідацію методики визначення супровідних домішок методом ВЕРХ у препараті з німесулідом у формі гранул для оральної суспензії, встановити нормування вмісту супровідних домішок у специфікації для контролю готового лікарського засобу.

**Матеріали та методи.** Вивчали зразок препарату Німесулід, гранули для оральної суспензії, 100 мг/2 г, виробництва АТ «Фармак». Дослідження здійснили, використавши рідинний хроматограф Agilent 1260 зі спектрофотометричним детектором. Для приготування стандартних розчинів домішок використали 2-феноксіанілін фірми Sigma-Aldrich, стандартні зразки німесуліду домішки D EP CRS та фірми LGC, німесулід для ідентифікації піків EP CRS. Для хроматографічного аналізу використовували ацетонітрил та амонію дигідрофосфат фірми Sigma-Aldrich.

**Результати.** Під час розроблення методики визначили концентрації розчинів, спосіб розчинення гранул, фільтри. Дібрали хроматографічну колонку, встановили вимоги придатності хроматографічної системи. Дослідили та врахували вплив компонентів плацебо. У процесі валідації проаналізували валідаційні характеристики: специфічність, лінійність, LOD, LOQ, прецизійність, правильність, робастність. Нормування вмісту домішок встановили за рекомендаціями ICH Q3B, враховуючи дані стресових досліджень, стабільності та домішок субстанції.

**Висновки.** Розробили аналітичну методику визначення супровідних домішок у препараті з німесулідом у формі гранул для оральної суспензії. Результати валідації показали, що методика придатна для здійснення аналізу. Встановили нормування вмісту домішок для специфікації контролю готового продукту.

**Ключові слова:** аналітична хімічна методика, німесулід, метод ВЕРХ, гранули для оральної суспензії, нормування домішок, валідація.

**Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2022. Т. 15, № 3(40). С. 259–265**

## Development and validation method for the determination of related substances in nimesulide granules for oral suspension

K. V. Tarapon, O. V. Tryhubchak

One of the key stages of pharmaceutical development is the development of analytical methods for quality control of medicines. The critical quality indicator is the content of related impurities, which may increase during shelf life of the product due to the degradation of the active substance, which in turn affects the quality of the product.

**The aim** of the work is to develop and validate the method for the determination of related impurities in nimesulide granules for oral suspension by HPLC method; to set the specification of finished product for related impurities.

**Materials and methods.** Sample of finish product Nimesulide, granules for oral suspension, 100 mg/2 g, it was manufactured by JSC "Farmak". The study was performed using Agilent 1260 liquid chromatograph with UV detector. 2-phenoxyaniline from Sigma-Aldrich, reference standards of nimesulide impurity D EP CRS and LGC, Nimesulide for peak identification EP CRS were used for preparation of standard impurity solutions. Acetonitrile and ammonium dihydrogen phosphate from Sigma-Aldrich were used for chromatographic analysis.

**Results.** When developing method, the concentrations of solutions, the method of dissolving granules, filters were selected. The chromatographic column was selected, the requirements for the chromatographic system suitability were set. The effect of placebo components has been studied and considered. During the validation the characteristics were studied: specificity, linearity, LOD, LOQ, precision, accuracy, robustness. The limits of the impurity content were established in accordance with the requirements of ICH Q3B

### ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/259472>

UDC 615.281:615.453.3].07

DOI: [10.14739/2409-2932.2022.3.259472](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2022.3.259472)

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 259–265

**Key words:** analytical chemistry method, nimesulide, method HPLC, granules for oral suspension, limits for impurities, validation.

\*E-mail: [k.tarapon@farmak.ua](mailto:k.tarapon@farmak.ua)

Received: 21.06.2022 // Revised: 26.07.2022 // Accepted: 05.08.2022

guideline, taking into account the data of stress studies, stability and impurities of the substance.

**Conclusions.** The analytical method for the determination of related substances in finish product nimesulide granules for oral suspension was developed. The validation results showed that the method is suitable for analysis. The specification limits of finished product for related impurities were set.

**Key words:** analytical chemistry method, nimesulide, method HPLC, granules for oral suspension, limits for impurities, validation.

**Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 259–265**

Метою сучасної фармацевтичної розробки є створення лікарських засобів (ЛЗ) відповідної якості та обґрунтування процесу їх виробництва для постійного випуску продукції з заданими функціональними характеристиками [1].

Один із ключових етапів фармацевтичної розробки – розроблення аналітичних методик для контролю якості готових лікарських засобів (ГЛЗ). Розроблений препарат має бути ефективним і безпечним, а також має забезпечувати точність дозування. Запровадження аналітичних методик, що підтверджують якість ЛЗ, гарантує дотримання цих вимог. Валідація аналітичних методик – одна з умов відповідності критеріям якості, а також можливості відтворення методик у лабораторії [2].

Вміст супровідних домішок належить до найважливіших показників якості ЛЗ. У процесі зберігання препарату може відбуватися зниження кількості діючої речовини в результаті її розкладання й утворення продуктів деградації (домішок). Це може знижувати фармакологічну активність препарату, а домішки можуть бути шкідливими для організму людини, тому нормативна документація обмежує кількість домішок у ЛЗ [3–5].

Препарат з діючою речовиною німесулід у формі гранул для оральної суспензії – один із нестероїдних протизапальних ЛЗ, що найчастіше застосовують у практиці. Його призначають для полегшення болю, запалення, лихоманки, під час терапії хронічного больового синдрому та захворювань опорно-рухового апарату [6,7].

Європейська фармакопея (ЄФ) регламентує вимоги до показника «Супровідні домішки» для субстанції німесулід [8]. Але враховуючи специфічну лікарську форму (гранули для оральної суспензії), а також особливості складу та технології розробленого препарату, необхідно було запропонувати власну методику, щоб дослідити вміст супровідних домішок у препараті на час випуску та в процесі дослідження стабільності. Сучасним методом є високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) [9].

## Мета роботи

Розробити та здійснити валідацію методики визначення супровідних домішок методом ВЕРХ у препараті з німесулідом у формі гранул для оральної суспензії, встановити нормування вмісту супровідних домішок у специфікації для контролю ГЛЗ.

## Матеріали і методи дослідження

Вивчали зразок препарату Німесулід, гранули для оральної суспензії, 100 мг/2 г, виробництва АТ «Фармак».

Для приготування стандартних розчинів домішок використали 2-феноксіанілін (німесулід домішка С) фірми Sigma-Aldrich, стандартний зразок німесуліду домішки D EP CRS, стандартний зразок німесуліду для ідентифікації піків EP CRS і стандартний зразок німесуліду домішки D фірми LGC.

Супровідні домішки у досліджуваних зразках визначали методом ВЕРХ за вимогами ДФУ, ЄФ (2.2.29), застосовуючи рідинний хроматограф Agilent 1260 зі спектрофотометричним детектором [8,9]. Для хроматографічного аналізу використали ацетонітрил та амонію дигідрофосфат фірми Sigma-Aldrich.

## Результати

Під час розроблення методики для визначення супровідних домішок у ГЛЗ за основу взяли методику, що описана в монографії ЄФ на субстанцію німесулід (Ph. Eur. 01/2017:1548) [8]. Враховували вплив компонентів плацебо на можливість детектування всіх продуктів розкладу, описаних для субстанції, а також домішок, що утворюються безпосередньо в процесі розкладу ГЛЗ. Під час розроблення методики для ГЛЗ необхідно було:

- за наведених у монографії умов дібрати колонку так, щоб уникнути інтерференції піків ідентифікованих домішок із компонентами плацебо;
- встановити можливість детектування всіх ідентифікованих домішок, наведених у монографії на субстанцію, під час аналізу ГЛЗ;
- розробити умови пробопідготовки, зважаючи на особливості лікарської форми (гранули для оральної суспензії) та вміст компонентів плацебо.

На початковому етапі розроблення розчин випробування готували так: наважку розтертих гранул, що відповідає 20 мг діючої речовини, поміщали в мірну колбу об'ємом 20 мл, додавали 8 мл ацетонітрилу, витримували на ультразвуковій бані протягом 10 хв і доводили водою до об'єму 20,0 мл (концентрація 1 мг/мл). Цей розчин перемішували та фільтрували через фільтр із розміром пор 0,45 мкм.

Визначаючи фільтр, випробували такі типи: «синя стрічка»; мембранний фільтр типу NY, 0,45 мкм; мембранний фільтр типу PTFE, 0,45 мкм; мембранний фільтр типу RC, 0,45 мкм. Застосувавши фільтр «синя стрічка», отримали не повністю прозорий фільтрат. У разі використання інших фільтрів одержали прозорий фільтрат, а власне фільтрування відбувалося швидко. Дослідження кількісного вмісту при використанні різних типів мембранних фільтрів не виявило різниці результатів, абсорбція не відбувається.

Таблиця 1. Хроматографічні колонки, що використані в процесі розроблення

Назва колонки	Параметри	Висновки
LiChrosorb RP-18	4,0 × 125 мм, розмір часток 5 мкм	Пік німесуліді домішки А має час утримування близько 1,6 хв, може інтерферувати з піками компонентів плацебо.
Nova-Pak C18	3,9 × 150 мм, розмір часток 5 мкм	Симетрія піку домішки А не відповідає вимогам (коефіцієнт симетрії ( $T_s$ ) >2).
XТerra RP-18	3,9 × 150 мм, розмір часток 5 мкм	Піки домішок німесуліді А, В, С, D, Е, F детектуються на цій колонці, мають відповідні коефіцієнти розділення. Час утримування домішки А – майже 3 хв, коефіцієнт симетрії ( $T_s$ ) = 1, піки компонентів плацебо не інтерферують із піками домішок.

Розчин порівняння (а) (для ідентифікації домішок С і D) готували аналогічно до описаного в монографії ЄФ на субстанцію: 5 мг 2-феноксіаніліну (німесуліді домішки С) розчиняли в 10 мл ацетонітрилу, доводили водою до 25,0 мл. 1,0 мл отриманого розчину доводили рухомою фазою до об'єму 50,0 мл. До 1,0 мл розчину, що одержали, додавали вміст флакону німесуліді домішки D EP CRS, попередньо розчинений в 1,0 мл ацетонітрилу.

Розчин порівняння (с) (для ідентифікації домішок А, В, Е, F) готували аналогічно до описаного в монографії ЄФ на субстанцію: 4 мг німесуліді для ідентифікації піків EP CRS, що містить домішки А, В, Е, F, розчиняли у 4 мл ацетонітрилу, доводили рухомою фазою до об'єму 10,0 мл.

Надалі методику допрацювали в розділі приготування розчинів. Зокрема:

- змінили концентрацію розчину випробування (зменшили до 0,5 мг/мл), оскільки з'ясували, що розчин у концентрації 1 мг/мл нестійкий внаслідок випадіння в осад компонентів плацебо (протягом 1 доби);

- змінили спосіб приготування випробуваного розчину: гранули розчиняли шляхом струшування колби з розчином на термошейкері протягом 30 хв (замість використання ультразвукової бані). Незважаючи на збільшення часу пробопідготовки, експериментальним шляхом доведено: саме в разі використання такого часу й умов відбувається повне вивільнення діючої речовини з гранул;

- під час приготування розчину порівняння (а) замість використання вмісту флакону німесуліді домішки D EP CRS застосовують наважку 5 мг стандартного зразка німесуліді домішки D фірми LGC для спрощення пробопідготовки та зменшення вартості аналізу. Розчин готують так: 5,0 мг 2-феноксіаніліну (німесуліді домішки С) та 5,0 мг стандартного зразку німесуліді домішки D розчиняють у 10 мл ацетонітрилу та доводять об'єм розчину водою Р до 25,0 мл; 1,0 мл цього розчину доводять рухомою фазою до об'єму 100,0 мл;

- додали розчин порівняння (b) (концентрація 0,2 %), який застосовують для розрахунку вмісту ідентифікованих і неідентифікованих домішок;

- розчин порівняння (с), що містить домішки А, В, Е, F, вилучили, оскільки за результатами стресових досліджень встановили: препарат є стабільним під дією різних стресових факторів і жодна домішка, що є продуктом деградації субстанції та наведена в монографії ЄФ, в препараті не зафіксована.

Умови хроматографування обрали аналогічно до описаних у монографії ЄФ: рухома фаза ацетонітрил – розчин рН 7.0 (1,15 г/л амонію дигідрофосфату) (35:65); швидкість рухомої фази – 1,3 мл/хв; детектування – за довжини хвилі 230 нм; об'єм проби, що вводять, – 20 мкл.

У процесі вибору оптимальної хроматографічної колонки апробували кілька колонок із різними параметрами (табл. 1).

У результаті досліджень, що здійснили, визначили оптимальну колонку для цього визначення – XТerra RP-18 розміром 3,9 × 150 мм із розміром часток 5 мкм.

Визначили такі параметри придатності хроматографічної системи:

- ступінь поділу піків німесуліді домішки С і німесуліді домішки D на хроматограмі розчину порівняння (а) становить не менше ніж 2;

- відносне стандартне відхилення площ піків німесуліді, розраховане з хроматограм розчину порівняння (b), має становити не більше ніж 3 %.

Відносний час утримування домішок щодо піка німесуліді (час утримування – майже 5 хв) становить для домішки С близько 2,4 хв, для домішки D – майже 3,5 хв.

Хроматограми розчину порівняння (а) (для ідентифікації домішок С і D) і розчину випробування наведено на рис. 1, 2.

У процесі розробки з'ясували, що один із компонентів плацебо – допоміжна речовина (ароматизатор) – детектується в умовах цієї методики, час утримування – майже 12 хв (рис. 3). Тому пік цього компонента виключили під час підрахунку вмісту домішок, що наведено в методиці.

Здійснили валідацію для підтвердження відповідності методики критеріям прийнятності. Валідацію здійснили згідно з вимогами ICH Q2B [10]. У процесі валідації вивчили такі характеристики: специфічність, лінійність, межа виявлення (LOD), межа кількісного визначення (LOQ), прецизійність, правильність, робастність. Результати валідаційних досліджень наведені в таблиці 2. Виявили, що всі названі валідаційні характеристики відповідають критеріям прийнятності, методика придатна для здійснення аналізу.

Для забезпечення регуляторної відповідності нормування вмісту ідентифікованих, неідентифікованих і суми домішок у специфікації встановили за рекомендаціями ICH Q3B [11], враховуючи дані стресових досліджень, нормування домішок у субстанції та прискорені дослідження стабільності.

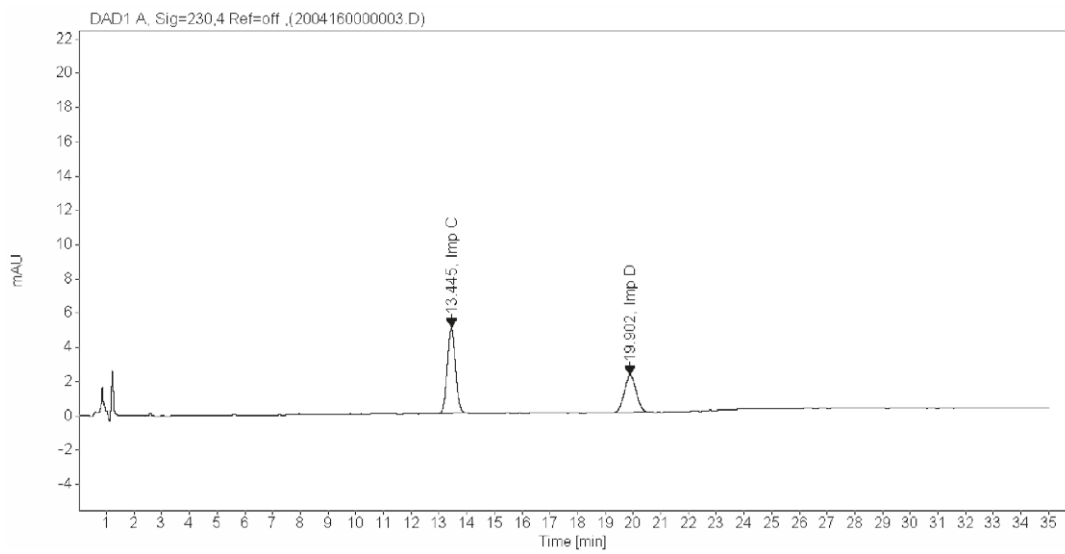


Рис. 1. Хроматограма розчину порівняння (а) (для ідентифікації домішок С і D).

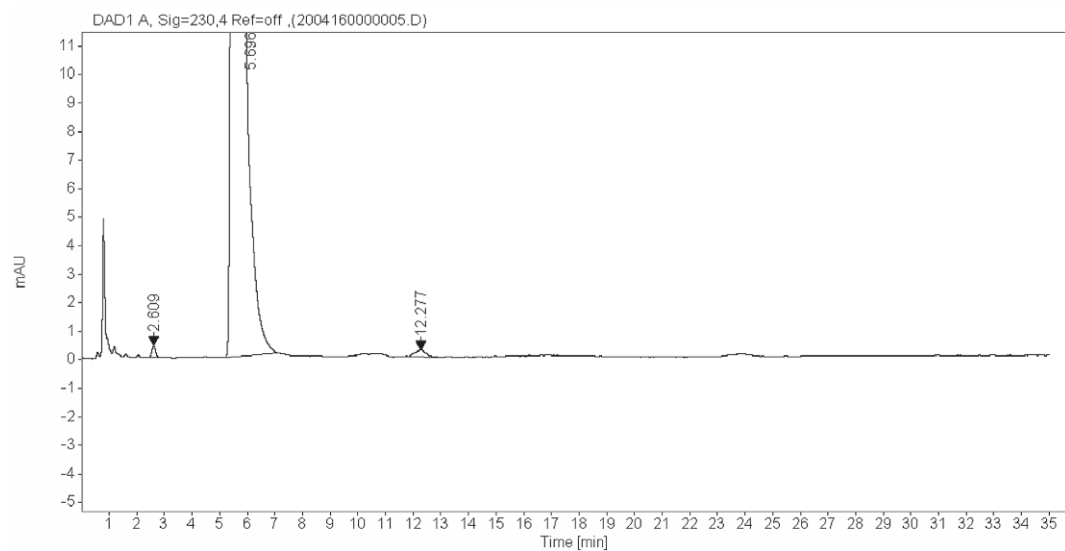


Рис. 2. Хроматограма розчину випробування.

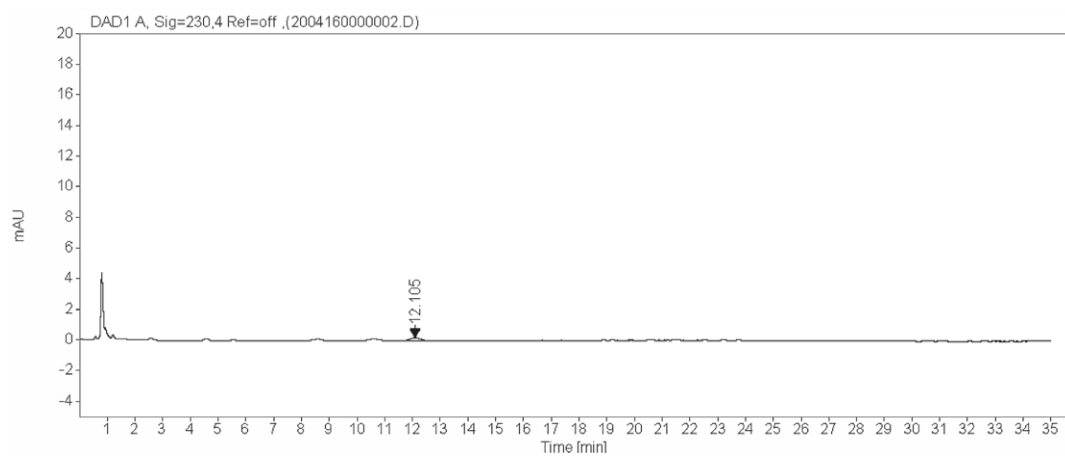


Рис. 3. Хроматограма розчину плацебо.

Таблиця 2. Результати валідації методики визначення супровідних домішок у препараті Німесулід, гранули для оральної суспензії

Валідаційна характеристика	Критерій прийнятності	Результати
Специфічність	Не має бути інтерференції піків досліджуваних домішок С і D з піком німесуліду, піками з компонентів плацебо ГЛЗ, розчинника та рухомої фази	Не виявили інтерференцію піків досліджуваних домішок С і D з піком німесуліду, піками з компонентів плацебо ГЛЗ, розчинника та рухомої фази
Лінійність	Коефіцієнт кореляції $R \geq 0,995$ . Вільний член лінійної залежності для регресійної прямої $ A  \leq 5,0 \%$ . Відносний фактор відгуку RRF (%) – 95–105 %	$R = 0,9996$ $A (\%) = 1,79267$ RRF (%): 96,63–101,80
Межа виявлення (LOD) та кількісного визначення (LOQ)	За будь-якою одиночною домішкою: $LOQ_{Single\ imp} \leq 0,50 \times 0,20 (\%) = 0,10 \%$ у перерахунку на німесулід	$LOD_{Single\ imp} = 0,007 \%$ $LOQ_{Single\ imp} = 0,022 \%$
Прецизійність		
Придатність хроматографічної системи	Коефіцієнт розділення піків німесуліду домішки С і німесуліду домішки D $\geq 2,0$ ; Відносне стандартне відхилення (RSD), %, розраховане для площ піків німесуліду за паралельними хроматограмами розчину порівняння (b) $\leq 3,0 \%$	Коефіцієнт розділення = 9,6 RSD = 0,4 %
Збіжність	RSD $\leq 10,0 \%$	<10,0 %
Внутрішньолабораторна прецизійність	RSD результатів аналізу для ВЛП має становити $\leq 15,0 \%$	RSD <15,0 %
Правильність	Середнє значення правильності визначення вмісту домішок С і D за кожним концентраційним рівнем має становити 90,0–110,0 %; Загальне за всіма трьома концентраційними рівнями значення правильності визначення вмісту домішок С і D має дорівнювати 90,0–110,0 %	Правильність аналітичної методики є достатньою
Робастність		
Стабільність розчинів	Варіабельність, розрахована для площі піка німесуліду в кожній часовій точці щодо площі піків у точці «0», має бути $\leq  10  \%$	Розчини стабільні за кімнатної температури протягом 24 годин
Надійність хроматографічної процедури: - швидкість потоку рухомої фази; - температура термостата хроматографічної колонки; - склад рухомої фази.	Відхилення співвідношення площ піків F щодо початкових умов має становити $\leq 10,0 \%$	Допустимі зміни швидкості потоку рухомої фази мають становити 1,26–1,34 мл/хв; Допустимі зміни температури термостата колонки мають становити 24,0–26,0 °C; Допустимі зміни складу рухомої фази мають становити 32,5–37,5 % вмісту ацетонітрилу

Згідно з рекомендаціями ICH Q3B, виходячи з максимальної добової дози препарату (200 мг), вміст ідентифікованих домішок у препараті має становити не більше ніж 0,5 %, неідентифікованих – не більше ніж 0,2 %. Не враховують домішки концентрацією менше ніж 0,1 %.

Відомо, що продуктами деградації ГЛЗ можуть бути домішки С (2-phenoxyaniline) і D (4-nitro-2-phenoxyaniline) [12–14]. Вміст цих домішок також збільшується в процесі стресових досліджень (під впливом луку). Тому саме їх вирішили ідентифікувати в ГЛЗ, незважаючи на те, що їх майже не було в розробленому препараті на час випуску.

Нормування цих домішок, відповідно до монографії ЄФ на субстанцію, становить не більше ніж 0,15 % кожної [8]. Отже, в ГЛЗ на час випуску встановлено ліміт домішки С – не більше ніж 0,2 %, D – не більше ніж 0,2 %. Результати прискорених досліджень стабільності не показали збільшення домішок С і D, тому нормування не більше ніж 0,2 % кожної встановлено і в процесі зберігання препарату.

Неідентифіковані домішки нормують за рекомендаціями ICH Q3B – не більше ніж 0,2 % [11]. Сума домішок, що встановили, – не більше ніж 1,0 %. У розрахунок не включали піки контрольного розчину, піки з відносним часом утримування до 0,3 хв і пік з відносним часом утримування майже 12 хв (піки плацебо). Не враховували домішки в концентрації менше ніж 0,1 %.

## Обговорення

У процесі розроблення методики визначення супровідних домішок у препараті методом ВЕРХ апробували та визначили оптимальні умови для детектування домішок, що належать до субстанції німесуліду, а також продуктів розкладу ГЛЗ. Валідація підтверджує відповідність методики критеріям прийнятності, методика є придатною для здійснення аналізу.

Встановили, що основними продуктами розкладу німесуліду є домішки С і D. Проте їхній вміст, а також концентрація інших неідентифікованих домішок у досліджених зразках препарату на час його випуску доволі

низький або нижчий від встановленої межі детектування. У разі збільшення вмісту домішок у процесі зберігання їхній кількісний вміст буде визначений за допомогою цього методу.

## Висновки

1. Розробили аналітичну методику визначення супровідних домішок методом ВЕРХ для препарату з діючою речовиною німесулід у формі гранул для оральної суспензії. Під час розроблення методики визначили концентрації розчинів діючої речовини та стандартних розчинів, спосіб розчинення гранул, фільтри. Встановили умови хроматографування, визначили хроматографічну колонку та вимоги щодо придатності хроматографічної системи. Дослідили та врахували вплив компонентів плацебо.

2. Здійснили валідацію методики, вивчили основні валідаційні характеристики: специфічність, лінійність, LOD, LOQ, прецизійність, правильність, робастність. Методика придатна для визначення супровідних домішок у цьому ГЛЗ.

3. Визначили склад і нормування ідентифікованих домішок у препараті. Встановили нормування вмісту неідентифікованих домішок і суми домішок для специфікації ГЛЗ відповідно до вимог ICH Q3D, враховуючи дані, що одержали в результаті досліджень із примусової деградації та прискореної стабільності.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

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

## Відомості про авторів:

Тарапон К. В., експерт сектора міжнародної регуляції, відділ фармацевтичної регуляції, АТ «Фармак», м. Київ, Україна.

ORCID ID: [0000-0002-4792-5313](https://orcid.org/0000-0002-4792-5313)

Тригубчак О. В., д-р фарм. наук, доцент, старший інженер технологічної лабораторії, відділ технологічної розробки, АТ «Фармак», м. Київ, Україна.

ORCID ID: [0000-0001-9140-3064](https://orcid.org/0000-0001-9140-3064)

## Information about authors:

Tarapon K. V., expert of the international regulation sector, Department of Pharmaceutical Regulation, JSC "Farmak", Kyiv, Ukraine.

Tryhubchak O. V., PhD, DSc, Associate Professor, Senior Engineer of the Technological Laboratory, Department of Technological Development, JSC "Farmak", Kyiv, Ukraine.

## Список літератури

- [1] ICH guideline Q8 (R2) on pharmaceutical development. Step 5 (EMA/CHMP/167068/2004). European Medicines Agency, 2017. 24 p. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use\\_en-11.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-11.pdf)
- [2] Берест Г. Г., Лукіна І. А., Бігдан О. А. *Фармацевтичний аналіз лікарських засобів*: навч. посіб. Ч. 2. Запоріжжя: ЗДМУ, 2017. 96 с.
- [3] Гуреева С. М., Кондратова Ю. А. Вивчення стабільності лікарського засобу Антраль, таблетки, вкриті оболонкою. *Фармацевтичний журнал*. 2016. № 2. С. 70-76.
- [4] Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products, Annex 2. *WHO Technical Report Series*, No. 953. Geneva: World Health Organization, 2009. P. 87-130.

- [5] ICH Topic Q6A Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances. Step 5 (CPMP/ICH/367/96). European Medicines Agency, 2020. 32 p. [https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/ich-q-6-test-procedures-acceptance-criteria-new-drug-substances-new-drug-products-chemical\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/ich-q-6-test-procedures-acceptance-criteria-new-drug-substances-new-drug-products-chemical_en.pdf)
- [6] Efficacy and Safety of Nimesulide in the Complex Treatment of Patients with Knee and Hip Osteoarthritis / A. E. Pikhak, A. Garg, N. Gupta et al. *EC Orthopaedics*. 2018. Vol. 9, Iss. 1. P. 12-18.
- [7] Зазірний І. М. Ефективність застосування препарату Німедар не поступається ефективності застосування препарату Німесил в ортопедичній практиці (проспективне дослідження). *Травма*. 2018. Т. 19, № 6. С. 19-27. <https://doi.org/10.22141/1608-1706.6.19.2018.152217>
- [8] European Pharmacopoeia Commission, & European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare. Monograph No. 453 Nimesulide (01/2017:1548). *European Pharmacopoeia*, 10th ed., Supplement 10.7. Council of Europe, 2010.
- [9] Державна Фармакопея України: в 3 т. / Держ. п-во «Укр. науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків: Держ. п-во «Укр. наук. фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. Т. 1. 1128 с.
- [10] Guideline for Industry. ICH Q2B Validation of Analytical Procedure: Methodology. FDA, 1996. 13 p. URL: <https://www.fda.gov/media/71725/download>
- [11] ICH Topic Q3B (R2) Impurities in New Drug Products. Step 5 Note for Guidance on Impurities in New Drug Products (CPMP/ICH/2738/99), European Medicines Agency, 2006. URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-3-b-r2-impurities-new-drug-products-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-3-b-r2-impurities-new-drug-products-step-5_en.pdf)
- [12] Kovaříková P., Mokry M., Klimes J. Photochemical stability of nimesulide. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003. Vol. 31, Iss. 4. P. 827-832. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00659-3](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00659-3)
- [13] Analytical method development and validation for the impurities of formulated nimesulide granules by RP-HPLC method / G. U. Kiran, B. M. Gurupadaya, S. G. Keshava et al. *Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences*. 2020. Vol. 11, Iss. 3. P. 8294-8299.
- [14] Quantification and in silico toxicity assessment of nimesulide and its related substances / N. N. M. Nagalakonda, R. S. Ananthula, K. P. C. Susarla et al. *Journal of Chromatographic Science*, 2017. Vol. 55, Iss. 5. P. 508-517. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmx003>

## References

- [1] European Medicines Agency. (2017). ICH Guideline Q8 (R2) on Pharmaceutical Development. Step 5 (EMA/CHMP/167068/2004). [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use\\_en-11.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-11.pdf)
- [2] Berest, H. H., Lukina, I. A., Bihdan, O. A. (2017) *Farmatsevtichnyi analiz likarskykh zasobiv* [Pharmaceutical analysis of drugs] (Vol. 2). Zaporizhzhia: ZDMU. [in Ukrainian].
- [3] Gureyeva, S. M., Kondratova, Yu. A. (2016) Vyvchennia stabilnosti likarskoho zasobu Antral, tabletky, vkryti obolonkoiu [Stability studying of antral film-coated tablets]. *Farmatsevtichnyi zhurnal*, (2), 70-76. [in Ukrainian].
- [4] World Health Organization (2009). Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products, Annex 2. In *WHO Technical Report Series*, No. 953.
- [5] European Medicines Agency (2020). ICH Topic Q6A Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances. Step 5 (CPMP/ICH/367/96). [https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/ich-q-6-test-procedures-acceptance-criteria-new-drug-substances-new-drug-products-chemical\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/ich-q-6-test-procedures-acceptance-criteria-new-drug-substances-new-drug-products-chemical_en.pdf)
- [6] Pikhak, A. E., Garg, A., Gupta, N., Khandarkar, S., & Akku, S. (2018). Efficacy and Safety of Nimesulide in the Complex Treatment of Patients with Knee and Hip Osteoarthritis. *EC Orthopaedics*, 9(1), 12-18.
- [7] Zazirnyi, I. M. (2018). Efektyvnist zastosuvannia preparatu Nimedar ne postupaetsia efektyvnosti zastosuvannia preparatu Nimesil v ortopedychnii praktytsi (prospektyvne doslidzhennia) [The effectiveness of Nimedar is not inferior to the effectiveness of Nimesil in orthopedic practice (prospective study)]. *Travma*, 19(6), 19-27. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.22141/1608-1706.6.19.2018.152217>

- [8] European Pharmacopoeia Commission, & European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare. Monograph No. 453 Nimesulide (01/2017:1548). In *European Pharmacopoeia*, 10th ed., Supplement 10.7; Council of Europe: Strasbourg, 2010.
- [9] State Enterprise Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center of Medicines Quality. (2015). *Derzhavna Farmakopeya Ukrayiny* [The State Pharmacopoeia of Ukraine] (Vol. 1, 2nd ed.). Kharkiv: State Enterprise Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center of Medicines Quality. [in Ukrainian].
- [10] FDA. (1996). Guideline for Industry. ICH Q2B Validation of Analytical Procedure: Methodology. <https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/1-12-5.pdf>
- [11] European Medicines Agency. (2006). ICH Topic Q3B (R2) Impurities in New Drug Products. Step 5 Note for Guidance on Impurities in New Drug Products (CPMP/ICH/2738/99). [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-3-b-r2-impurities-new-drug-products-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-3-b-r2-impurities-new-drug-products-step-5_en.pdf)
- [12] Kovaříková, P., Mokry, M., & Klimeš, J. (2003). Photochemical stability of nimesulide. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31(4), 827-832. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00659-3](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00659-3)
- [13] Kiran, G. U., Gurupadayya, B. M., Keshava, S. G., Jakkam, R., Dahake, M. N., & Eedara, S. R. (2020). Analytical method development and validation for the impurities of formulated nimesulide granules by RP-HPLC method. *Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences*, 11(3), 8294-8299.
- [14] Nagulakonda, N. N. M., Ananthula, R. S., Susarla, K. P. C., Krishnamurthy, T., & Gollapalli, N. R. (2017). Quantification and in silico toxicity assessment of nimesulide and its related substances. *Journal of Chromatographic Science*, 55(5), 508-517. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmx003>



# Search for potential hypoglycemic agents among potassium salts of 3-benzyl-8-substituted xanthines

K. V. Aleksandrova <sup>ID</sup>\*A,F, Ye. S. Pruhlo <sup>ID</sup>B,C, Ye. K. Mykhalchenko <sup>ID</sup>B,C,  
O. S. Shkoda <sup>ID</sup>D,E, O. Yu. Cherchesova <sup>ID</sup>F

Zaporizhzhia State Medical 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

Nowadays, the prevalence of metabolic syndrome (MS) is a serious problem among the world's population. Metabolic syndrome includes the so-called “deadly” quartet – hypertension, type 2 diabetes mellitus (diabetes mellitus), dyslipidemia and alimentary obesity.

After all, type 2 diabetes is included in the list of pathologies of the metabolic syndrome, it is important to find ways to alleviate the disease. Derivatives of such a heterocyclic system as xanthine are of great interest in this aspect.

**The aim** of the study was to explore the hypoglycemic activity of newly synthesized water-soluble derivatives of 3-benzyl-8-substituted xanthines.

**Materials and methods.** We obtained water-soluble potassium 3-benzyl-8-R-xanthin-7-ides, the structure and individuality of which were confirmed by a set of physical-chemical studies.

**Results.** The hypoglycemic effect of the newly synthesized compounds was assessed by an oral glucose tolerance test. The obtained data were processed using modern statistical *in silico*-methods.

**Conclusions.** The results of the hypoglycemic activity study among the potassium salts of 3-benzyl-8-substituted xanthine derivatives showed, that some new compounds are in close vicinity to the reference drug's hypoglycemic action.

**Key words:** xanthines, organic synthesis, hypoglycemic activity.

**Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 266–270**

## Пошук потенційних гіпоглікемічних засобів серед калієвих солей 3-бензил-8-заміщених ксантинів

К. В. Александрова, Є. С. Пругло, Є. К. Михальченко,  
О. С. Шкода, О. Ю. Черчесова

Нині поширеність метаболічного синдрому (МС) – актуальна проблема всесвітньої охорони здоров'я. Метаболічний синдром включає в себе так званий «смертельний» квартет: артеріальну гіпертензію, цукровий діабет (ЦД) 2 типу, дисліпідемію та аліментарне ожиріння.

Цукровий діабет 2 типу належить до переліку патологій метаболічного синдрому, й актуальним є пошук засобів, які б давали змогу полегшити перебіг захворювання. В цьому аспекті чималий науковий інтерес викликають похідні такої гетероциклічної системи, як ксантин.

**Мета роботи** – дослідження гіпоглікемічної активності новосинтезованих водорозчинних похідних 3-бензил-8-заміщених ксантинів.

**Матеріали та методи.** Одержали водорозчинні калій 3-бензил-8-R-ксантиніди-7, будову та індивідуальність яких підтверджено комплексом фізико-хімічних досліджень.

**Результати.** Гіпоглікемічну дію новосинтезованих сполук оцінили за допомогою перорального тесту толерантності до глюкози. Результати опрацювали за допомогою сучасних статистичних *in silico*-методів.

**Висновки.** Результати дослідження гіпоглікемічної активності серед новосинтезованих калієвих солей 3-бензил-8-заміщених ксантинів підтверджують наявність сполук, що за рівнем гіпоглікемічної дії наближаються до референс-препарату.

**Ключові слова:** ксантини, органічний синтез, гіпоглікемічна активність.

**Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2022. Т. 15, № 3(40). С. 266–270**

### ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/253385>

UDC 615.252.349.7.015.11:547.857.4-38  
DOI: [10.14739/2409-2932.2022.3.253385](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2022.3.253385)

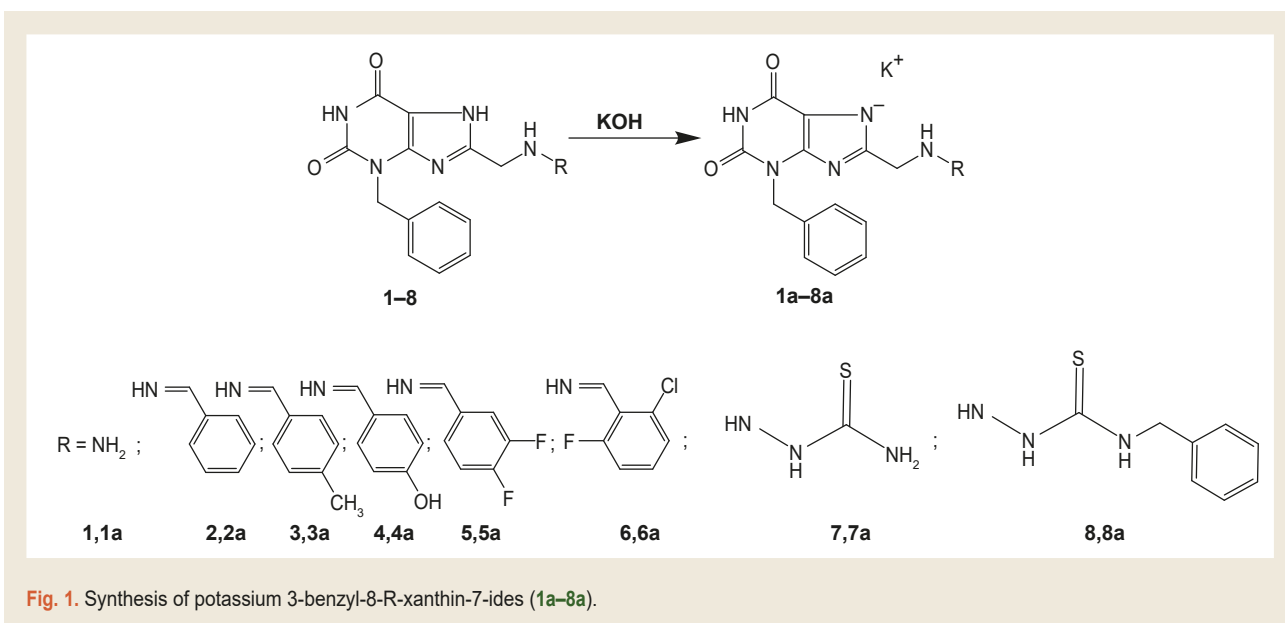
**Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 266–270**

**Key words:** xanthines, organic synthesis, hypoglycemic activity.

\*E-mail: [aleksandrovaev55@gmail.com](mailto:aleksandrovaev55@gmail.com)

Received: 22.02.2022 // Revised: 10.03.2022 // Accepted: 22.03.2022





According to the WHO, the prevalence of diabetes has almost quadrupled since 1980 and is now the ninth leading cause of death in the world [1]. Diabetes mellitus type 2 (T2DM) is on the rise worldwide and it's considered to be a global epidemic of our age. The most important goal of treatment of T2DM is the timely prescription of intensive antidiabetic therapy for targeting specific levels of carbohydrate and lipid metabolism in such patients to prevent the progression of vascular complications, which increases mortality [1].

Modern treatment of T2DM involves a set of measures aimed at maintaining good glycemic control, which involves dietary restriction, regular exercise, and finally, taking antidiabetic drugs [2]. The drug should be chosen by considering its effect on metabolic processes, cardiovascular system, and the development of hypoglycemic conditions. According to the clinical guidelines, standard drug treatment is started with metformin, with the subsequent application of sulfonylurea (e. g. Glibenclamide), and DPP-4 and SGLT-2 inhibitors [3,4].

In our previous work [5] we showed the efficacy of 7-substituted 3-benzyl-8-propylxanthin application in the treatment of metabolic syndrome pathologies, which possess high hypoglycemic effect. Thus, we can conclude, that synthesis of new xanthine-based drug candidates with hypoglycemic activity can be very promising.

### Aim

The aim of the present study was to explore hypoglycemic activity of new water-soluble derivatives of 3-benzyl-8-substituted xanthines.

### Materials and methods

In our previous study [6], we synthesized novel 3-benzyl-8-R-xanthine derivatives. Conversion of the latter into water-soluble potassium salts gave us good objects for pharmacological study.

Potassium 3-benzyl-8-R-xanthin-7-ides (**1a–8a**). A mixture of 0.003 mol of the original xanthine (**1–8**) and 0.0036 mol of potassium hydroxide in 10 ml of water was boiled until completely dissolved. The solution was filtered hot, and the filtrate was cooled, acetone was added until product precipitation, which was filtered off, washed with acetone, diethyl ether and dried at 80–85 °C (Fig. 1). All synthesized substances were crystalline colorless or yellowish powders, well soluble in water, insoluble in acetone and chloroform.

The melting point was determined by open capillary method on the PTM device (M). Elemental analysis was performed on an Elementar Vario L cube. <sup>1</sup>H NMR spectra of the compounds **1–8** revealed protons' signals of the xanthine moiety. Meanwhile, the protons of the aliphatic and aromatic groups resonate with the corresponding shifts [6]. <sup>1</sup>H NMR spectra recorded on a Bruker SF-400 spectrometer (solvent DMSO-*d*<sub>6</sub> or DMSO-*d*<sub>6</sub> + CDCl<sub>4</sub>, internal standard – TMS).

The hypoglycemic activity of xanthine derivatives was assessed by an oral glucose tolerance test [7]. This test is performed after 12 hours of fasting and it's started from the first blood sample taken out of incision at the tip of the tail (time -0.5 hours) and test solutions are inserted. After 30 minutes (0 hours), the blood glucose level is measured, then the rats are injected with 20 % glucose solution (2 g/kg body weight) through a rigid gastric tube. Blood samples are collected at 0.5, 1, 2 and 4 hours.

A drop of blood was obtained by creating a puncture at the end of the tail with a scalpel. The basal level of glucose in the blood was measured (-0.5 hours). All subsequent samples were taken through this wound. The total amount of blood used was approximately 30–40 μl.

In experimental studies, 70 Wistar rats about 300 g were used, which underwent the acclimatization for 14 days.

All manipulations with animals were performed out in accordance with the requirements of GLP, the recommendations of "European Union Directive 2010/63 / EU on the protection of animals used for scientific purposes" [8].

**Table 1.** Hypoglycemic activity of synthesized compounds (1a–8a)

	Time, min						AUC, mmol* <sup>h</sup> /l
	-30	0	30	60	120	240	
<b>1a</b>	4.00 ± 0.07 -11.11 *P < 0.001 **P < 0.01	4.54 ± 0.05 1.92 *P > 0.05 **P > 0.05	9.27 ± 0.10 12.28 *P < 0.001 **P < 0.01	9.00 ± 0.12 0.64 *P > 0.05 **P > 0.05	5.99 ± 0.12 -3.90 *P > 0.05 **P > 0.05	6.61 ± 0.06 1.09 *P > 0.05 **P > 0.05	30.25 ± 0.20 0.58 *P > 0.05 **P > 0.05
<b>2a</b>	4.47 ± 0.07 -0.63 *P > 0.05 **P > 0.05	4.47 ± 0.05 0.32 *P > 0.05 **P > 0.05	8.40 ± 0.14 1.73 *P > 0.05 **P > 0.05	8.96 ± 0.14 0.16 *P > 0.05 **P > 0.05	6.16 ± 0.10 -1.15 *P > 0.05 **P > 0.05	6.23 ± 0.08 -4.80 *P < 0.01 **P < 0.01	29.74 ± 0.20 -1.13 *P > 0.05 **P > 0.05
<b>3a</b>	4.47 ± 0.09 -0.63 *P > 0.05 **P > 0.05	4.31 ± 0.03 -3.21 *P > 0.05 **P < 0.05	8.90 ± 0.12 7.79 *P < 0.01 **P < 0.01	9.36 ± 0.11 4.63 *P < 0.05 **P < 0.05	6.51 ± 0.06 4.59 *P < 0.05 **P < 0.01	6.51 ± 0.06 -0.44 *P > 0.05 **P > 0.05	31.03 ± 0.17 3.17 *P < 0.001 **P < 0.01
<b>4a</b>	4.81 ± 0.08 6.98 *P < 0.05 **P < 0.01	4.43 ± 0.04 -0.64 *P > 0.05 **P > 0.05	8.20 ± 0.13 -0.69 *P > 0.05 **P > 0.05	8.97 ± 0.12 0.32 *P > 0.05 **P > 0.05	5.17 ± 0.06 -16.97 *P < 0.001 **P < 0.001	5.87 ± 0.07 -10.26 *P < 0.001 **P < 0.001	27.88 ± 0.15 -7.32 *P < 0.001 **P < 0.01
<b>5a</b>	4.47 ± 0.06 -0.63 *P > 0.05 **P > 0.05	4.19 ± 0.03 -6.09 *P < 0.05 **P < 0.01	8.37 ± 0.11 1.38 *P > 0.05 **P > 0.05	9.61 ± 0.12 7.51 *P < 0.01 **P < 0.01	6.29 ± 0.07 0.92 *P > 0.05 **P > 0.05	6.56 ± 0.05 0.22 *P > 0.05 **P > 0.05	30.59 ± 0.16 1.72 *P < 0.05 **P < 0.05
<b>6a</b>	4.37 ± 0.08 -2.86 *P > 0.05 **P > 0.05	4.3 ± 0.08 -3.53 *P > 0.05 **P < 0.05	8.01 ± 0.13 -2.94 *P > 0.05 **P > 0.05	9.09 ± 0.10 1.6 *P > 0.05 **P > 0.05	6.41 ± 0.07 2.98 *P > 0.05 **P > 0.05	6.47 ± 0.04 -1.09 *P > 0.05 **P > 0.05	30.16 ± 0.21 0.27 *P > 0.05 **P > 0.05
<b>7a</b>	5.11 ± 0.06 13.65 *P < 0.001 **P < 0.001	4.40 ± 0.07 -1.28 *P > 0.05 **P > 0.05	7.84 ± 0.12 -5.02 *P < 0.05 **P < 0.05	9.5 ± 0.16 6.23 *P < 0.05 **P < 0.05	6.61 ± 0.15 6.19 *P < 0.05 **P < 0.05	7.43 ± 0.05 13.54 *P < 0.001 **P < 0.001	31.88 ± 0.24 5.99 *P < 0.001 **P < 0.01
<b>8a</b>	4.46 ± 0.08 -0.95 *P > 0.05 **P > 0.05	4.63 ± 0.07 3.85 *P > 0.05 **P > 0.05	7.14 ± 0.14 -13.49 *P < 0.001 **P < 0.01	9.71 ± 0.09 8.63 *P < 0.001 **P < 0.01	6.31 ± 0.12 1.38 *P > 0.05 **P > 0.05	6.90 ± 0.04 5.46 *P < 0.001 **P < 0.001	30.66 ± 0.29 1.94 *P > 0.05 **P > 0.05
<b>Control group</b>	4.5 ± 0.07 0 *P = 1 **P > 0.05	4.46 ± 0.08 0 *P = 1 **P > 0.05	8.26 ± 0.10 0 *P = 1 **P > 0.05	8.94 ± 0.10 0 *P = 1 **P > 0.05	6.23 ± 0.08 0 *P = 1 **P > 0.05	6.54 ± 0.04 0 *P = 1 **P > 0.05	30.08 ± 0.15 0 *P = 1 **P > 0.05
<b>Glibenclamide</b>	4.61 ± 0.086 2.54 *P > 0.05 **P > 0.05	4.54 ± 0.037 1.92 *P > 0.05 **P < 0.05	7.40 ± 0.14 -10.38 *P < 0.001 **P < 0.01	5.46 ± 0.15 -38.98 *P < 0.001 **P < 0.01	5.13 ± 0.13 -17.66 *P < 0.001 **P < 0.01	4.33 ± 0.06 -33.84 *P < 0.001 **P < 0.001	23.24 ± 0.33 -22.73 *P < 0.001 **P < 0.01

Mean ± standard deviation of the arithmetic mean (mmol/l), the ratio to the control group in %: \*P: Student's t-test; \*\*P: Mann–Whitney U test.

Rats were obtained from the regular animal chamber of the Institute of Pharmacology and Toxicology of the Academy of Medical Sciences of Ukraine. Care, keeping and feeding of animals was carried out in standard conditions of stable microclimate in the vivarium of the ZSMU. A light-dark regime was maintained at 12:12. Animals had ad libitum access to food (standardized ration feed “Rezon-1” KP-120-1) and water that was processed (acidified (pH 5.8–6.4), chlorinated (6–8 ppm), softened, and filtered (0.02 μm)).

Experimental samples' sizes were calculated by the formula [9] with standard deviation (±1.31 mmol/l) [10]. We expect the effect to be 2 mmol/l [11], where the sample size  $n = 2; 1.312(1.96 + 0.842)^2/22 = 6.74$ , i. e., 7 animals per study group.

Randomization and grouping were performed using pseudo-random sequences of the “random” module for the python programming language [12].

The results were processed by modern computer-aided statistical methods using NumPy (BSD License), SciPy (BSD License), pandas (BSD License), pandas-profiling (MIT License) libraries. For data visualization Python matplotlib library (BSD License) was used [13].

The normality hypothesis test of the studied indicators was tested using the Shapiro–Wilk test and the Kolmogorov–Smirnov test. The arithmetic mean (M) and standard error of the mean (±m) were calculated. The statistical significance of intergroup differences according to the obtained data was established using the parametric Student's t-test (\*) and the non-parametric Mann–Whitney U test (P\*\*\*).

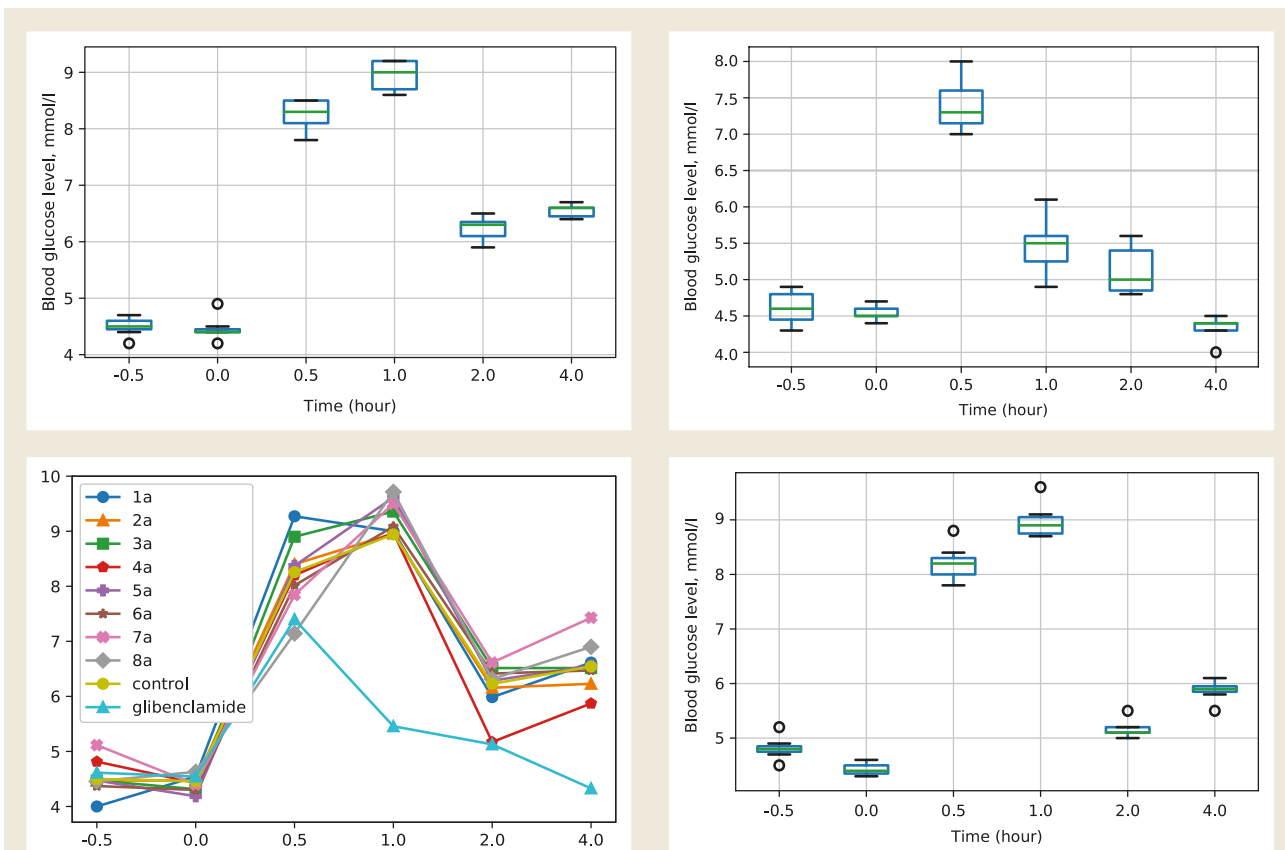


Fig. 2. Changes in glucose levels of experimental animals under OGTT conditions.

The research results were interpreted by applying three difference levels of statistical significance –  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ .

## Results

The results of the study of hypoglycemic activity of xanthine derivatives by the oral glucose tolerance test are shown in *Table 1* and *Fig. 2*.

## Discussion

After processing and analyzing the results (*Table 1*, *Fig. 2*), it was found that glibenclamide was most effectively reduced glucose in OGTT conditions ( $AUC 23.24 \pm 0.33$ ), which was 22.73 lower than in the control group ( $*P < 0.001$ ,  $**P < 0.01$ ).

An increase in glucose levels was observed in all groups in 30 min after administration of glucose solution, in compounds **2a**, **4a**, **5a**, **6a** this indicator was equal to the control group ( $*/**P > 0.05$ ), and no statistically significant differences were observed. The presence of the hydrazide group in xanthine moiety (**1a**) led to a significant hyperglycemic action in 1 h after its administration, while the replacement of the hydrazide group by the ylidene hydrazide moiety led to increased hypoglycemic effect in compounds **2a**, **3a**, **4a**, **5a**. The introduction of carbathioamide fragments into xanthine core (**7a**, **8a**) led to an increase of glucose level.

In 2 h and 4 h, only compound **4a** approached the standard of glibenclamide by its hypoglycemic activity. Thus, we can conclude, that the presence of a hydroxyl group as a substituent in the benzyl moiety of ylidenehydrazides positively contributes to glucose lowering. It also worth mentioning, that halogens and/or methyl groups do not affect hypoglycemic action.

## Conclusions

The results of the hypoglycemic activity study among the potassium salts of 3-benzyl-8-substituted xanthine derivatives showed, that some new compounds were in close vicinity to the reference drug's hypoglycemic action.

## Funding

The research is carried out within the RDW of Zaporizhzhia State Medical University "Synthesis and investigation of physicochemical and biological properties of 1,3,7,8-substituted xanthine derivatives", state registration No. 0122U000099.

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

## Information about authors:

Aleksandrova K. V., PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Biological Chemistry, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.  
ORCID ID: [0000-0003-4436-4036](https://orcid.org/0000-0003-4436-4036)

Pruhlo Ye. S., PhD, DSc, Associate Professor of the Department of Clinical Pharmacy, Pharmacognosy and Pharmaceutical Chemistry, Head of the Department of Experimental Research with a Vivarium, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0002-4705-7261](https://orcid.org/0000-0002-4705-7261)

Mykhalchenko Ye. K., PhD, Assistant of the Department of Biological Chemistry, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0002-6388-2966](https://orcid.org/0000-0002-6388-2966)

Shkoda O. S., PhD, Associate Professor of the Department of Biological Chemistry, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0002-5678-2801](https://orcid.org/0000-0002-5678-2801)

Cherchesova O. Yu., PhD, Assistant of the Department of Biological Chemistry, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0001-9798-7128](https://orcid.org/0000-0001-9798-7128)

#### Відомості про авторів:

Александрова К. В., д-р хім. наук, професор, зав. каф. біологічної хімії, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Пругло Є. С., д-р фарм. наук, доцент каф. клінічної фармації, фармакогнозії та фармацевтичної хімії, керівник відділу

експериментальних досліджень з віварієм, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Михальченко Є. К., PhD, асистент каф. біологічної хімії, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Шкода О. С., канд. фарм. наук, доцент каф. біологічної хімії, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Черчесова О. Ю., канд. фарм. наук, асистент каф. біологічної хімії, Запорізький державний медичний університет, Україна.

#### References

- [1] WHO (2016, October 21). Global report on diabetes: Executive Summary. <https://www.who.int/publications/item/who-nmh-nvi-16.3>
- [2] Humphrey, L. L., Kansagara, D., Qaseem, A., High Value Care Committee of the American College of Physicians, Centor, R., DeLong, D. M., Gantzer, H. E., Horwitch, C. A., Jokela, J. A., Li, J., Lohr, R. H., López, A. M., & McLean, R. M. (2018). World Health Organization Guidelines on Medicines for Diabetes Treatment Intensification: Commentary From the American College of Physicians High Value Care Committee. *Annals of internal medicine*, 169(6), 398-400. <https://doi.org/10.7326/M18-1148>
- [3] Doyle-Delegado, K., Chamberlain, J. J., Shubrook, J. H., Skolnik, N., & Trujillo, J. (2020). Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment of Type 2 Diabetes: Synopsis of the 2020 American Diabetes Association's Standards of Medical Care in Diabetes Clinical Guideline. *Annals of internal medicine*, 173(10), 813-821. <https://doi.org/10.7326/M20-2470>
- [4] Inoue, H., Tamaki, Y., Kashihara, Y., Muraki, S., Kakara, M., Hirota, T., & Ieiri, I. (2019). Efficacy of DPP-4 inhibitors, GLP-1 analogues, and SGLT2 inhibitors as add-ons to metformin monotherapy in T2DM patients: a model-based meta-analysis. *British journal of clinical pharmacology*, 85(2), 393-402. <https://doi.org/10.1111/bcp.13807>
- [5] 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>
- [6] Aleksandrova, K. V., Levich, S. V., Mykhal'chenko, 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>
- [7] Kuo, F. Y., Cheng, K. C., Li, Y., & Cheng, J. T. (2021). Oral glucose tolerance test in diabetes, the old method revisited. *World journal of diabetes*, 12(6), 786-793. <https://doi.org/10.4239/wjd.v12.i6.786>
- [8] European Parliament (2010). Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Communities*, L276, 33-79. <https://www.legislation.gov.uk/eu/dr/2010/63/contents>
- [9] Charan, J., & Kantharia, N. D. (2013). How to calculate sample size in animal studies?. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*, 4(4), 303-306. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.119726>
- [10] Wang, Z., Yang, Y., Xiang, X., Zhu, Y., Men, J., & He, M. (2010). [Estimation of the normal range of blood glucose in rats]. *Wei sheng yan jiu = Journal of hygiene research*, 39(2), 133-142.
- [11] Chaimum-aom, N., Chomko, S., & Talubmook, C. (2017). Toxicology and oral glucose tolerance test (OGTT) of Thai medicinal plant used for diabetes controls, *Phyllanthus acidus* L. (Euphorbiaceae). *Pharmacognosy Journal*, 9(1), 58-61. <https://doi.org/10.5530/pj.2017.1.11>
- [12] Frassia, M. G. (2018, March 5-7). Enhanced statistical thinking in secondary school with python programming language: a realistic mathematics education approach. *Proceedings of the 12th International Technology, Education and Development Conference* (pp. 3462-3471). <http://dx.doi.org/10.21125/inted.2018.0666>
- [13] Python. *GitHub*. <https://github.com/chendaniely/2021-07-13-scipy-pandas>



# Вивчення мутагенного впливу з прогнозом канцерогенності 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну для наступних досліджень із метою створення нового лікарського препарату протигрибкової активності

I. В. Бушуєва<sup>1</sup>, К. В. Петрова<sup>2</sup>, Б. П. Киричко<sup>3</sup>, В. В. Парченко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Запорізький державний медичний університет, Україна, <sup>2</sup>Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна, <sup>3</sup>Полтавський державний аграрний 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

Нині все ширшим стає розроблення ефективних і безпечних лікувальних засобів із використанням похідних 1,2,4-тріазолу. Цінність таких препаратів визначається швидкою та пролонгованою біологічною дією, що не супроводжується різкими змінами гомеостазу та вираженими побічними ефектами, характерними для більшості фармакологічних препаратів синтетичного походження. В умовах обмеженого асортименту вітчизняних протимікробних і протигрибкових ветеринарних лікарських засобів на національному фармацевтичному ринку одним із напрямів вирішення цієї задачі є пошук, розроблення та дослідження лікарських засобів із протимікробною та протигрибковою активністю.

**Мета роботи** – вивчення мутагенного впливу з прогнозом канцерогенності 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну з перспективою створення нових лікарських форм для лікування грибкових патологій шкіри.

**Матеріали та методи.** Для вивчення дії 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну *in vitro* використали *Staphylococcus aureus*, штам 209, його мутанти УФ-2, УФ-3 і первинні клітинні культури. Облік генних мутацій мікроорганізмів у системі метаболічної активації (тест Еймса) здійснили за методикою Л. М. Фонштейна згідно з «Методичними рекомендаціями з оцінки мутагенних властивостей нових лікарських засобів» (Київ, 1996 р.), доповненою методикою за рекомендаціями «Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів» (за ред. І. Я. Коцюмба).

**Результати.** Результати вивчення активності 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну на моделі культури пухлинних асцитних клітин показали, що в концентраціях 1,4 мг/мл, 0,8 мг/мл, 0,3 мг/мл, 0,015 мг/мл він сприяє регресу пухлинних клітин карциноми Ерліха і саркоми С-37. У досліджах зі штамом Nk/L у таких самих концентраціях 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфолін істотно сповільнював зростання клітин.

Результати досліджень вказують на виражену цитогенетичну дію тіофосфаміду і сарколізину, що припускає їхню метаболічну активацію в організмі; про це свідчить виражена аберація хромосом. Порівнявши цитогенетичну дію еквімолярних концентрацій, не виявили цитогенетичну активність 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну.

**Висновки.** Позитивні результати вивчення специфічної активності 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну в досліджах *in vitro* свідчать про доцільність його широкого вивчення на експериментальних пухлинах тварин. Ба більше, мутагенну дію не виявили в дозах, що застосували для прогнозування канцерогенності. Отже, зробили висновок про відсутність цитогенетичного ефекту.

**Ключові слова:** 1,2,4-похідні тріазолу, мутаген, канцероген, протипухлинна активність, цитогенетична активність.

**Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2022. Т. 15, № 3(40). С. 271–276**

## Study of mutagenic effects with predicted carcinogenicity of 4-((5-decylthio)-4-methyl-4-H-1,2,4-triazole-3-yl)methyl) morpholine for further research in order to create a new drug with antifungal activity

I. V. Bushuieva, K. V. Petrova, B. P. Kyrychko, V. V. Parchenko

The development of effective and safe therapeutic agents using 1,2,4-triazole derivatives is gaining momentum in today's conditions. The value of such drugs is determined by the rapid and prolonged biological action, which is not accompanied by abrupt changes in homeostasis and pronounced side effects, which are characteristic of most pharmacological drugs of synthetic origin. In the context of a

### ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/261790>

UDC 615.31:547.792'211.024'867.4]:015:575.224.4]:615.282-043.83

DOI: [10.14739/2409-2932.2022.3.261790](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2022.3.261790)

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 271–276

Key words: 1,2,4-triazole derivatives, mutagens, carcinogens, antitumor activity, cytogenetic activity.

\*E-mail: [valery999@ukr.net](mailto:valery999@ukr.net)

Received: 27.07.2022 // Revised: 29.08.2022 // Accepted: 05.09.2022

limited range of domestic antimicrobial and antifungal veterinary drugs on the national pharmaceutical market, one of the directions for solving this problem is the search, study, research, and development of drugs with antimicrobial and antifungal activity.

**The aim of this work** was to study the mutagenic effects with the prediction of carcinogenicity of 4-((5-decylthio)-4-methyl-4-*H*-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)morpholine with the prospect of further creation of new dosage forms for the treatment fungal pathologies of the skin.

**Materials and methods.** Staph was used to study the effect of 4-((5-decylthio)-4-methyl-4-*H*-1,2,4-triazol-3-yl)methyl)morpholine in vitro *Staphylococcus aureus*, strain 209, its UV-2, UV-3 mutants and primary cell cultures. Accounting for gene mutations of microorganisms in the system of metabolic activation (Ames test) was carried out according to the method of L. M. Fonshtein in accordance with the requirements of "Methodological recommendations for assessing the mutagenic properties of new medicinal products" (Kyiv, 1996), supplemented by the methodology according to the recommendations of "Preclinical research of veterinary medicinal products" (edited by I. Ya. Kotsiumbas).

**Results.** The results of studying the activity of 4-((5-decylthio)-4-methyl-4-*H*-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)morpholine on a model of culture of tumor ascetic cells showed that at concentrations of 1.4 mg/ml, 0.8 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.015 mg/ml it was led to the regression of tumor cells of Ehrlich's carcinoma and C-37 sarcoma. In experiments with the Nk/L y strain, the same concentrations of 4-((5-decylthio)-4-methyl-4-*H*-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)morpholine significantly slowed down cell growth. The results of the studies indicate a pronounced cytogenetic effect of thiophosamide and sarcolysin, which suggests their metabolic activation in the body, as evidenced by a pronounced aberration of chromosomes. When comparing the cytogenetic effect of equimolar concentrations, the absence of cytogenetic activity of 4-((5-decylthio)-4-methyl-4-*H*-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)morpholine was revealed.

**Conclusions.** The positive results of studying the specific activity of 4-((5-decylthio)-4-methyl-4-*H*-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)morpholine in experiments in vitro were obtained which indicates the expediency of its extensive study in experimental animal tumors. In addition, according to these studies, no mutagenic effect was found at the doses that were used to predict carcinogenicity. Thus, it can be concluded that there is no cytogenetic effect.

**Key words:** 1,2,4-triazole derivatives, mutagens, carcinogens, antitumor activity, cytogenetic activity.

**Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 271–276**

Нині все ширшим у ветеринарній медицині стає розроблення ефективних і безпечних лікувальних засобів із використанням похідних 1,2,4-тріазолу. Цінність таких препаратів визначається швидкою та пролонгованою біологічною дією, що не супроводжується різкими змінами гомеостазу та вираженими побічними ефектами, характерними для більшості фармакологічних препаратів синтетичного походження.

Діюча речовина, яка є тіопохідною 1,2,4-тріазолу, а саме 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну, є перспективною сполукою для створення лікарських засобів для ветеринарної медицини, зокрема, для лікування грибкових захворювань шкіри тварин [7–13].

Незважаючи на новітні досягнення вітчизняної фармації щодо створення протигрибкових препаратів для застосування у ветеринарній медицині, асортимент засобів такої дії на національному фармацевтичному ринку доволі обмежений. Тому удосконалення фармакотерапії шкірних захворювань – актуальне завдання фармакології. Одним із напрямів його вирішення є пошук, розроблення та дослідження лікарських засобів із протимікробною та протигрибковою активністю.

На етапі попередніх фармакологічних досліджень визначили фізико-хімічні властивості субстанції (розчинність, схильність до кристалізації, стійкість, стабільність) [1–3], але мутагенний вплив і наступний прогноз канцерогенності 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну досі не вивчали.

## Мета роботи

Вивчення мутагенного впливу з прогнозом канцерогенності 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну з перспективою створення нових лікарських форм для лікування грибкових патологій шкіри.

## Матеріали і методи дослідження

Протипухлинну активність 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну вивчали в дослідях in vitro, застосовуючи комплекс методів первинного відбору із залученням науково-дослідницького колективу навчально-наукової лабораторії інфекційної патології, гігієни, санітарії та біобезпеки Полтавського державного аграрного університету. Для вивчення дії 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну in vitro використовували *Staphylococcus aureus*, штам 209, його мутанти УФ-2, УФ-3 та первинні клітинні культури.

Дослідження здійснили за загальноприйнятими мікробіологічними методиками, використовуючи для культивування штаму 209 звичайне живильне середовище (МПА), а для мутантів – спеціальне середовище. Найкращі за відтворюваністю результати одержали в разі застосування рідкого середовища, що є наслідком тіснішого контакту препаратів із тест-мікробами. Тому дослідження здебільшого здійснили на бульйоні, а агар застосовували для визначення життєздатності мікроорганізмів після їх контакту з 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліном у рідкому середовищі. Контроль – посіви на рідке середовище з додаванням розчинника (фізіологічного розчину). Вплив 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну на первинні клітинні культури вивчали за загальноприйнятою методикою, яку доповнили математичним визначенням тенденції клітин до розмноження або до регресу.

Обчислення здійснили за формулою:

$$f = 1/t - \lg \text{NKT/Non} \quad (\text{од/добу}) \quad (1)$$

де  $t$  – час культивування клітин;

Non – кількість клітин у пробірках із 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліном;

NKT – кількість клітин у контролі.

Таблиця 1. Вплив 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну на ріст тест-мікробів

Параметр	Тест-мікроб	4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфолін	Тіофосфамід
Величина «мертвої» зони (концентрація препаратів 1 мг/мл)	УФ-2	0,05–0,03	-
	УФ-3	0,15	-
	209	-	-
Бактерицидна концентрація	УФ-2	1:8000	1:5000
	УФ-3	1:8000	1:5000
	209	-	-

Таблиця 2. Вплив 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну на пухлинні клітини в культурі

Препарат	Концентрація препарату, мг/мл	Типи клітин					
		Nk/L		Ерліха		С-37	
		N	f	N	f	N	f
4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфолін	1,4	18	0,02	-116	-0,177	-10,4	-0,007
	0,8	20	0,02	-38	-0,53	-10,7	-0,007
	0,3	21	0,02	-27	-0,018	-4	0,138
	0,015	23	0,027	5	0,03	55	0,143
Контроль	–	903	0,15	89,6	0,17	89,8	0,16

N: відсоток приросту клітин; f: величина, що позначає тенденцію клітин до розмноження (+).

Визначаючи f у контролі, значення Non замінювали кількістю клітин при зберіганні в холодильнику. Позитивне значення величини f показувало тенденцію клітин до розмноження, негативне – до регресу.

## Результати

**Противухлинна активність 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну в досліді in vitro.** Дослідження здійснили сумісно з науково-дослідницьким колективом навчально-наукової лабораторії інфекційної патології, гігієни, санітарії та біобезпеки Полтавського державного аграрного університету.

За схемою дослідження 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфолін у чотирьох розведеннях вивчили на трьох видах асцитних клітин: Nk/Ly, Ерліха, С-37. Загалом здійснили 24 визначення. Для з'ясування впливу 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну на морфологію клітин у культурі, зокрема КБ і ПІ, клітинний моношар отримували за відомим методом. На третій добі культивування в середовище додавали 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфолін і вирощували клітини ще 3 доби. Одержані клітинні препарати фіксували в рідині Карнуа (1,0–1,5 год), забарвлювали гематоксилін-еозином та укладали в бальзам [4–6].

Попереднє вивчення 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну здійснили в чашках Петрі з дисками. Виявили, що цей препарат пригнічує ріст двох культур мутантів без впливу на початковий штам (табл. 1, 2).

Результати вивчення активності 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну на моделі культури пухлинних асцитних клітин показали, що в концентраціях 1,4 мг/мл, 0,8 мг/мл, 0,3 мг/мл, 0,015 мг/мл він сприяє регресу пухлинних клітин карциноми Ерліха і саркоми С-37 (табл. 2). У досліді зі штамом Nk/Ly ці самі концентрації 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну істотно уповільнювали зростання клітин.

Вивчаючи дію 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну на одношарову клітинну культуру КБ, зареєстрували цитопатогенний ефект тільки для концентрації 1,8 мг/мл. Наступне розведення препарату до 0,3 мг/мл призводить до збереження частини моношару, а при вмісті 0,15 мг/мл у середовищі культивування видимі зміни не відбувалися.

Отже, позитивні результати вивчення специфічної активності 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну в досліді in vitro свідчать про доцільність продовження його вивчення на експериментальних пухлинах тварин.

**Цитогенетична активність 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну.** Здійснили порівняльне дослідження цитогенетичної дії 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну на клітинах кісткового мозку самців щурів лінії Вістар віком 2–3 місяці. Результати наведено в таблиці 3. Дози є еквімолярними, збігаються із терапевтичними.

Результати досліджень свідчать про виражену цитогенетичну дію тіофосфаміду і сарколізину. Тому можна припустити їхню метаболічну активацію в організмі, підтверджену вираженою аберацією хромосом. Порів-

Таблиця 3. Цитогенетична активність 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну

Форма досліджу	Доза, мг/кг	Кількість клітин	Структурні порушення					Загалом клітин з аберацією		p
			Одиничні фрагменти	Парні фрагменти	Обміни	Центричні кільця	Клітини з пошкодженнями	Кількість	%	
Контроль	–	1000	5	–		–	–	3	0,40 ± 0,10	–
Тіофосфамід	4	500	188	8	110	10	22	172	37,50 ± 2,11	<0,001
Сарколізин	14	200	57	62	13	15	38	119	65,40 ± 2,77	<0,001
4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну	1800	200	6	3	–	–	–	13	7,70 ± 0,53	<0,5
	1200	200	5	–	–	–	–	8	2,30 ± 0,55	>0,5
	800	200	3	–	–	–	–	5	1,30 ± 0,20	>0,5
	300	200	–	–	–	–	–	–	–	–
	150	200	–	–	–	–	–	–	–	–

Таблиця 4. Облік генних мутацій мікроорганізмів (тест Еймса)

Тест-штам	Речовина	Доза, мкг/г	Кількість колоній реверантів на чашку							
			метаболічна активація				без метаболическої активації			
			X <sub>1</sub> , абс./лг	X <sub>2</sub> , абс./лг	X <sub>3</sub> , абс./лг	Сер., лг	X <sub>1</sub> , абс./лг	X <sub>2</sub> , абс./лг	X <sub>3</sub> , абс./лг	Сер., лг
<i>Salmonella typhimurium</i>	4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну	0,1	6/1,37	6/1,66	4/1,37	1,44	7/1,87	7/1,77	8/2,09	1,89
		1,0	4/1,66	5/1,74	4/1,42	1,68	6/1,88	5/1,49	6/1,41	1,48
		10,0	5/1,77	7/1,85	7/2,12	1,83	8/2,28	11/1,96	9/2,28	2,21
		100,0	8/2,38	8/2,13	9/2,26	2,21	10/2,35	13/2,24	13/2,38	2,19
		1000,0	13/2,54	13/2,46	12/2,38	2,51	31/3,48	18/2,66	21/3,12	3,17
	Тіофосфамід	200,0	21/2,28	20/2,12	14/2,77	3,18	25/3,55	28/3,55	29/3,39	3,44
	Контроль ефективності	–	9/2,33	18/2,87	17/2,83	2,77	9/2,20	8/2,08	5/1,61	2,02

X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>: кількість колоній на чашку; абс.: абсолютна кількість; лг: значення логарифма, відповідне кількості реверантів.

нявши цитогенетичну дію еквімолярних концентрацій, не виявили цитогенетичну активність 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну.

В експериментах із 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліном через 24 години після його введення в рівновіддалених концентраціях (від 1/2 до 1/10 ЛД<sub>50</sub>) хромосомні пошкодження не зафіксували. Цей дослід передбачає з'ясування можливої кумуляції 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну (5 введень у дозі 1/5 ЛД<sub>50</sub>). У результаті не виявили цитогенетичну активність досліджуваної речовини. Це свідчить про її перспективність для клінічного вивчення в умовах пухлинного росту.

**Результати обліку генних мутацій мікроорганізмів у системі метаболическої активації (тест Еймса).** Під час скринінгу біологічно активних речовин важливе встановлення їхньої потенційної мутагенності шляхом виявлення потенційного мутагенезу (тест Еймса) та визначення генетичної токсичності методом цитогенетичних досліджень на тваринах.

Метод обліку генних мутацій полягає в здатності сполуки індукувати генні мутації мікроорганізмів у

системі метаболическої активації (Л. М. Фонштейн та ін., 1977 р.). Застосовують тестові штами бактерій *Salmonella typhimurium* TA 100, 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну, печінку щурів з кофакторами (НАДФ, глюкозо-6-фосфат). У результаті функціонування системи мікосомального окиснення під впливом ферментів у гомогенаті печінки сполука, яку вивчали, може метаболізувати й індукувати мутації, якщо вона має мутагенну дію.

Досліди здійснили за методикою Л. М. Фонштейна згідно з «Методичними рекомендаціями з оцінки мутагенних властивостей нових лікарських засобів» (Київ, 1996 р.). Оцінювання результатів здійснили на підставі статистично опрацьованих матеріалів досліджень, що наведені в таблиці 4.

Далі за методикою 0,1 мл розчину 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-Н-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну в діапазоні 0,1–1000,0 мкг вносили в 2,5 мл агару, додавали 0,1 мл тестових штамів і 0,5 мл мікосомальної активуючої суміші (МС+). Суміш перемішували, негайно переносили на агар, позбавлений гістидину. Досліди супроводжувались відповідними контролюями. Дослідження здійснили з



повною (МС+) і неповною (МС-) системою метаболічної активації (табл. 4).

Результати враховували, якщо були позитивні контролю, тобто якщо в ньому виявлена мутагенна дія. Через 48 годин інкубації за температури 37 °С обраховували кількість реверантних колоній. Ступінь мутагенного впливу за цих умов досліду оцінена знаком «-».

## Висновки

1. Позитивні результати вивчення специфічної активності 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)метилморфоліну в дослідних *in vitro* свідчать про доцільність його широкого вивчення на експериментальних пухлинах тварин.

2. Мутагенну дію не виявили в дозах, що застосували для прогнозування канцерогенності. Отже, зробили висновки про відсутність цитогенетичного ефекту.

**Перспективи подальших досліджень.** Результати дали змогу спланувати наступні дослідження ембріолетального, фето- й ембріотоксичного ефектів 4-((5-децилтіо)-4-метил-4-*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)метилморфоліну в постнатальному періоді.

## Подяка

Колектив авторів статті щиро дякують Збройним силам України та редакції наукового журналу «Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки і практики» за можливість здійснювати дослідження та публікувати їхні результати.

## Фінансування

Дослідження здійснене в рамках виконання дисертаційної роботи.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

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

## Відомості про авторів:

Бушуєва І. В., д-р фарм. наук, професор, зав. каф. управління і економіки фармації та фармацевтичної технології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0002-5336-3900](https://orcid.org/0000-0002-5336-3900)

Петрова К. В., аспірант, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

ORCID ID: [0000-0001-8612-2268](https://orcid.org/0000-0001-8612-2268)

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

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

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

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

## Information about authors:

Bushuieva I. V., PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Management and Pharmacy Economics, Medical and Pharmaceutical Law, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Petrova K. V., PhD student, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

Kyrychko B. P., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Surgery and Midwifery, Poltava State Agrarian University, Ukraine.

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

## Список літератури

- [1] Пат. 138684, Україна. Спосіб лікування дерматологічних захворювань / В. П. Мартинишин, В. М. Гунчак, О. І. Панасенко та ін. № u201904928 ; заявл. 10.05.2019 ; опубл. 10.12.2019, бюл. № 23/2019. URL: <https://sis.ukrpatent.org/uk/search/detail/1396036/>
- [2] Evaluation of acute and subacute toxicity of oil liniment based on 4-((5-(decylthio)-4-methyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)methyl)morpholine / R. Shcherbyna, V. Parchenco, V. Martynyshyn, V. Hunchak. *Ankara Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi*. 2018. Vol. 42, Iss. 1. P. 43-52.
- [3] Synthesis, antibacterial, antiurease, and antioxidant activities of some new 1,2,4-triazole schiff base and amine derivatives / B. B. Sokmen, N. Gumrukcuoglu, S. Ugras et al.. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2015. Vol. 175, Iss. 2. P. 705-714. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1307-2>
- [4] Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів / І. Я. Коцюмбас, О. Г. Малик, І. П. Патерега та ін.; за ред. І. Я. Коцюмбаса. Львів : Тріада плюс, 2006. 360 с.
- [5] Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. реком. / за ред. О. В. Стефанова ; Держ. фармакол. центр. Київ, 2001. 527 с.
- [6] Положення про Комітет з питань етики (біоетики) : наказ Міністерства освіти, науки, молоді та спорту України від 19.11.2012 № 1287. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v1287736-12#Text>
- [7] Застосування морфоліній 2-[5-(піридин-4-іл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо]ацетату для лікування і профілактики деяких захворювань / І. В. Бушуєва, Л. І. Пархоменко, Є. Г. Книш, О. І. Панасенко. *Запорізький медичний журнал*. 2014. № 2. С. 97-99. <https://doi.org/10.14739/2310-1210.2014.2.25443>
- [8] Anti-Inflammatory, Antiviral Veterinary Medicine with ImmunoModulating Activity / N. N. Borisenko, I. V. Bushuieva, V. V. Parchenko et al. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2019. Vol. 12, Iss. 11. P. 5255-5259. <http://dx.doi.org/10.5958/0974-360X.2019.00909.0>
- [9] Trifuzol suppositories usage results on the course of endometrial inflammatory processes in cows / X. G. Klosova, I. V. Bushuieva, V. V. Parchenko et al. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2019. Vol. 10, Iss. 1. P. 1215-1223.
- [10] Trifuzol – new original veterinary drug / I. Bushuieva, V. Parchenko, R. Shcherbyna et al. *Ankara Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi*. 2017. Vol. 41, Iss. 1. P. 42-49. [https://doi.org/10.1501/Eczfak\\_0000000594](https://doi.org/10.1501/Eczfak_0000000594)
- [11] Застосування препарату «Авесстим» для підвищення ефективності вакцинопрофілактики та вплив препарату на резистентність курчат / І. В. Бушуєва, А. В. Березовський, Є. Г. Книш, О. І. Панасенко. *ScienceRise*. 2014. Т. 4, № 1. С. 94-97. <https://doi.org/10.15587/2313-8416.2014.29279>
- [12] Borisenko, N. N., Gubenko, I. Y., Parchenko, V. V., & Bushuieva, I. V. (2019) The Efficacy Tests Results Of The Veterinary Drug" Trifuzol 1% Solution For Injection". *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 10(1), 102-107.
- [13] Вивчення впливу морфоліній 2-[5-(піридин-4-іл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо]ацетату на профілактику стресових станів / І. В. Бушуєва, Б. П. Киричко, Є. Г. Книш та ін. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2014. № 2. С. 64-66.

## References

- [1] Martynyshyn V. P., Hunchak, V. M., Panasenko, O. I., Parchenko, V. V., & Shcherbyna R. O. (2019). *Sposib likuvannia dermatolohichnykh zakhvoriuvan* [Method of treatment of dermatological diseases]. Ukraine Patent UA 138684. <https://sis.ukrpatent.org/uk/search/detail/1396036/>
- [2] Shcherbyna, R., Parchenco, V., Martynyshyn, V., & Hunchak, V. (2018). Evaluation of acute and subacute toxicity of oil liniment based on 4-((5-(decylthio)-4-methyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)methyl)morpholine. *Ankara Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi*, 42(1), 43-52.
- [3] Sokmen, B. B., Gumrukcuoglu, N., Ugras, S., Sahin, H., Sagkal, Y., & Ugras, H. I. (2015). Synthesis, antibacterial, antiurease, and antioxidant activities of some new 1,2,4-triazole schiff base and amine derivatives. *Applied biochemistry and biotechnology*, 175(2), 705-714. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1307-2>
- [4] Kotsiumbas, I. Ya., Malyk, O. H., Patereha, I. P., Tishyn, O. L., & Kosenko, Yu. M. (2006). *Doklinichni doslidzhennya veterynarnykh likarskykh zasobiv* [Preclinical studies of veterinary medicinal products]. Triada plus. [in Ukrainian].
- [5] Stefanov, O. V. (Ed.). (2001). *Doklinichni doslidzhennya likarskykh zasobiv* [Preclinical studies of medicines]. Kyiv: Avitsena. [in Ukrainian].
- [6] Ministry of Education and Science. (2012, November 19). *Polozhennia pro Komitet z pytan etyky (bioetyky)* [Regulations on the Committee on Ethics (Bioethics) (No. 1287)]. <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v1287736-12#Text>

- [7] Bushueva, I. V., Parkhomenko, L. I., Knysh, Ye. H., & Panasenko, O. I. (2014). Zastosuvannia morfolinii 2-[5-(pirydyn-4-il)-1,2,4-triazol-3-iltio]atsetatu dlia likuvannia i profilaktyky deiakyykh zakhvoriuvan [Application of the morpholines of 2-[5-(pyridin-4-yl)-1,2,4-triazol-3-ylthio] acetates for the treatment and prevention of some diseases]. *Zaporozhye medical journal*, (2), 97-99. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.14739/2310-1210.2014.2.25443>
- [8] Borisenko, N. N., Bushuieva, I. V., Parchenko, V. V., Gubenko, I. Ya., Mykhailiuk, Ye. O., Riznyk, O. I., Aleksieiev, O. G., Gutyj, B. V., Ly-sianska, H. P., & Kurinnyi, A. V. (2019). Anti-Inflammatory, Antiviral Veterinary Medicine with Immuno-Modulating Activity. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 12(11), 5255-5259. <http://dx.doi.org/10.5958/0974-360X.2019.00909.0>
- [9] Klosova, X. G., Bushueva, I. V., Parchenko, V. V., Shcherbyna, R. O., Samura, T. O., Gubenko, I. Y., Gutyj, B. V., & Khariv, I. I. (2019). Trifuzol suppositories usage results on the course of endometrial inflammatory processes in cows. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 10(1), 1215-1223.
- [10] Bushueva, I., Parchenko, V., Shcherbyna, R., Safonov, A., Kaplaushenko, A., Gutyj, B., & Hariv, I. (2017). Tryfuzol – new original veterinary drug. *Ankara Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi*, 41(1), 42-49. [https://doi.org/10.1501/Eczfak\\_0000000594](https://doi.org/10.1501/Eczfak_0000000594)
- [11] Bushuieva, I. V., Berezovskyi, A. V., Knysh, Ye. H., & Panasenko, O. I. (2014). Zastosuvannia preparatu "Avesstym" dlia pidvyshchennia efektyvnosti vaksynoprofilaktyky ta vplyv preparatu na rezystentnist kurchat [Use of the drug "Avastin" to increase the effectiveness of vaccination and the effect of the drug resistance of chickens]. *Science Rise*, 4(1), 94-97. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.15587/2313-8416.2014.29279>
- [12] Borisenko, N. N., Gubenko, I. Y., Parchenko, V. V., & Bushueva, I. V. (2019). The efficacy tests results of the veterinary drug "Trifuzol 1% solution for injection". *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 10(1), 102-107.
- [13] Bushueva, I. V., Kirichko, B. P., Knish, E. G., Panasenko, O. I., & Izdepskiy V. I. (2014). Vyvchennia vplyvu morfolinii 2-[5-(pirydyn-4-il)-1,2,4-triazol-3-iltio]atsetatu na profilaktyku stresovykh staniv [The study of morpholinium 2-[5-(pyridin-4yl)-1,2,4-triazol-3-ylthio]acetate effect on prevention of stressful conditions]. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*, (2), 64-66. [in Ukrainian].



## Порівняльне вивчення специфічної активності м'яких апікаційних лікарських засобів з вінпоцетином

V. V. Gladyshev <sup>1,A</sup>, D. M. Romanina <sup>1,C</sup>, O. B. Kharapona <sup>2,B</sup>, A. V. Kurinnyi <sup>1,B</sup>,  
I. V. Hnitko <sup>3,E</sup>, I. O. Pukhalska <sup>1,F</sup>, S. A. Gladysheva <sup>1,D</sup>

<sup>1</sup>Запорізький державний медичний університет, Україна, <sup>2</sup>Дніпровський державний медичний університет, Україна, <sup>3</sup>Східноукраїнський національний університет імені Володимира Даля, м. Северодонецьк, Україна

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

У сучасній неврології основною складовою успішного лікування цереброваскулярної патології вважають фармакотерапію. Разом із тим, арсенал ефективних лікарських засобів доказової медицини в цій галузі доволі обмежений. Один із препаратів, що здійснюють ефективну вибірку корекцію мозкової перфузії, – вінпоцетин (кавінтон). Використання альтернативних шляхів всмоктування вінпоцетину (ректального та назального) в певних м'яких апікаційних лікарських формах дасть змогу істотно збільшити біодоступність лікарської речовини, знизити рівень побічних реакцій від його застосування і розширити фармакотерапевтичний арсенал вітчизняних ефективних нейропротективних препаратів. Враховуючи це, співробітники кафедри технології ліків Запорізького державного медичного університету на підставі комплексних фізико-хімічних, фармакотехнологічних, реологічних і біофармацевтичних досліджень запропонували раціональні рецептури та технології двох нових м'яких апікаційних лікарських форм вінпоцетину: супозиторіїв ректальних на ліпофільній основі та крему назального на емульсійній основі – для терапії артеріальної гіпертензії II–III стадій із цереброваскулярними ускладненнями, зменшення проявів неврологічних та/або психічних симптомів при різних формах недостатності мозкового кровообігу, наслідків інсульту, транзиторної ішемічної атаки тощо.

**Мета роботи** – дослідження специфічної активності запропонованих інноваційних апікаційних лікарських форм вінпоцетину.

**Матеріали та методи.** Як об'єкт доклінічних досліджень використали назальну мазь, що містить 0,5 % вінпоцетину, на емульсійній основі та супозиторіїв ректальні з вінпоцетином 0,01 г на ліпофільному носії, що забезпечують оптимальне вивільнення активного фармацевтичного інгредієнта. Специфічну активність розроблених лікарських форм вінпоцетину вивчали на моделі гострого порушення мозкового кровообігу (ГПМК) за типом ішемічного інсульту. Таблетки вінпоцетину (Астрафарм, Україна), які застосовують у неврологічній практиці досить ефективно і впродовж тривалого часу, використовували як препарат порівняння.

**Результати.** Призначення всіх досліджуваних препаратів сприяло підвищенню рухової активності. Крім цього, призначення лікарських форм вінпоцетину зменшувало розвиток когнітивно-мнестичних розладів після ГПМК. Найкращий результат зафіксували у групі тварин, які інтраназально курсом отримували вінпоцетин. У групах тварин, що одержували протягом 4 діб препарати вінпоцетину, достовірно знижувалися маркери оксидативного стресу (АФГ і КФГ). Найбільшу активність мала лікарська форма вінпоцетину, яку вводили інтраназально протягом 4 діб. Уведення лікарських форм вінпоцетину мало енерготропний вплив, що виявляли за збільшенням рівня макроергічних фосфатів. Очевидно, вінпоцетин чинить прямий позитивний вплив на трикарбонів ділянку циклу Кребса та сприяє збільшенню продукції АТФ. Найбільша енерготропна активність властива назальному крему вінпоцетину, що застосовували інтраназально протягом 4 діб.

**Висновки.** Доклінічними дослідженнями розроблених апікаційних м'яких лікарських засобів із вінпоцетином на моделі ГПМК за типом ішемічного інсульту експериментально підтверджено виражену нейропротективну активність ректальних супозиторіїв і назального крему з вінпоцетином. Виявили, що ефективність від терапії цими апікаційними лікарськими формами доказово перевищує таку для пероральних таблетованих засобів.

**Ключові слова:** порушення мозкового кровообігу, вінпоцетин, м'які апікаційні лікарські засоби, нейропротективна дія.

**Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2022. Т. 15, № 3(40). С. 277–282**

### Comparative study of the specific activity of soft application drugs with vinpocetine

V. V. Hladyshev, D. M. Romanina, O. B. Kharapona, A. V. Kurinnyi, I. V. Hnitko, I. O. Pukhalska, S. A. Hladysheva

In modern neurology, the main component of successful treatment of cerebrovascular pathology is pharmacotherapy. At the same time, the arsenal of effective medicines of evidence-based medicine in this area is quite limited. Vinpocetine (Cavinton) is one of the drugs that effectively selectively corrects cerebral perfusion. The use of alternative ways of absorption of vinpocetine (rectal and nasal) in certain soft application dosage forms will allow to significantly increase the bioavailability of the medicinal substance, reduce the level of adverse reactions from its use and expand the pharmacotherapeutic arsenal

#### ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/264032>

UDC 615.225:615.454.1].015.154  
DOI: [10.14739/2409-2932.2022.3.264032](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2022.3.264032)

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 277–282

**Key words:** violation of cerebral blood flow, circulation, vinpocetine, soft application drugs, neuroprotective effect.

\*E-mail: [gladishevvv@gmail.com](mailto:gladishevvv@gmail.com)

Received: 19.08.2022 // Revised: 06.09.2022 // Accepted: 09.09.2022

of domestic effective neuroprotective drugs. Taking into account the above, the employees of the Department of Medicines Technology of Zaporizhzhia State Medical University, on the basis of complex physical-chemical, pharmacotechnological, rheological and biopharmaceutical research, proposed rational formulations and technologies of two new soft application dosage forms of vinpocetine – rectal suppositories on a lipophilic basis and nasal cream on an emulsion basis for the therapy of arterial hypertension of II–III stages with cerebrovascular complications, reduction of the manifestation of neurological and/or mental symptoms in various forms of cerebral blood circulation insufficiency, consequences of a stroke, transient ischemic attack, etc.

**The aim** of the work is to study the specific activity of the proposed innovative application dosage forms of vinpocetine.

**Materials and methods.** Nasal ointment containing 0.5 % vinpocetine on an emulsion basis and rectal suppositories with vinpocetine 0.01 g on a lipophilic carrier were used as the object of preclinical studies, which ensure optimal release of the active pharmaceutical ingredient. The study of the specific activity of the developed medicinal forms of vinpocetine was carried out on a model of acute cerebrovascular accident of the type of ischemic stroke. Vinpocetin tablets (Astrapharm, Ukraine), which are used in neurological practice quite effectively and over a long period of time, were used as a comparison drug.

**Results.** The comparative results showed that the appointment of all studied drugs led to an increase in motor activity. In addition, the administration of medicinal forms of vinpocetine reduced the development of cognitive and cognitive disorders after acute disorders of cerebral blood circulation. It was found that the highest result was shown by the group of animals that received a course of vinpocetine intranasally. In the groups of animals that received vinpocetine for 4 days, markers of oxidative stress – aldehyde phenylhydrazones and ketone phenylhydrazones – were significantly reduced. The highest activity was demonstrated by the pharmaceutical form of vinpocetin, which was used intranasally for 4 days. The introduction of dosage forms of vinpocetine exerted an energizing effect, which was expressed in an increase in the level of macroergic phosphates. Evidently, vinpocetine has a direct positive effect on the three-carbon sections of the Krebs cycle and increases the production of adenosine triphosphate (ATP). At the same time, the vinpocetine nasal cream applied intranasally for 4 days demonstrated the greatest energizing activity.

**Conclusions.** Preclinical studies of the developed application soft medicines with vinpocetine on the model of acute cerebrovascular accident type ischemic stroke experimentally confirmed the expressed neuroprotective activity of rectal suppositories and nasal cream with vinpocetine and it was found that the effectiveness of therapy with these application medicinal forms is demonstrably higher than that in comparison with oral tablet means.

**Key words:** violation of cerebral blood flow, circulation, vinpocetine, soft application drugs, neuroprotective effect.

**Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 277–282**

Порушення мозкового кровообігу в більшості розвинених країн світу посідають одне з провідних місць з-поміж основних причин смертності та інвалідизації населення. В Україні інсульту належить друге місце після кардіоваскулярних захворювань, перше – як причині стійкої втрати працездатності. Незважаючи на досягнення останніх років у галузі інтенсивної терапії, неврології та фармакології, летальність від гострих порушень мозкового кровообігу (ГПМК) залишається вкрай високою [1].

Крім того, дуже поширеними є хронічні форми цереброваскулярної патології, що реєструють в Україні як дисциркуляторну енцефалопатію. Ця патологія – результат хронічної недостатності мозкового кровообігу, що повільно прогресує, призводить до розвитку множинних дрібноосередкових некрозів мозкової тканини та спричиняє посилення порушення функцій головного мозку [2].

У сучасній неврології основною складовою успішного лікування цереброваскулярної патології вважають фармакотерапію. Разом із тим, арсенал ефективних лікарських засобів доказової медицини в цій галузі доволі обмежений. Один із препаратів, що здійснюють ефективну вибірку корекцію мозкової перфузії, – вінпоцетин (кавінтон) [3].

Відомо, що при пероральному введенні чимало фармакологічних препаратів інактивуються ферментами кишкового тракту навіть у разі використанні ліпосом, що захищають субстанцію від руйнування ферментами.

Актуальною залишається проблема хімічної модифікації лікарської речовини під час проходження через печінку (феномен «першого проходження через печінку»). Ін'єкційне введення вінпоцетину малодоступне в амбулаторних умовах, не дуже зручне та не доцільне в педіатричній практиці [4].

Використання альтернативних шляхів всмоктування вінпоцетину (ректального та назального) в певних м'яких аплікаційних

лікарських формах дасть змогу істотно збільшити біодоступність лікарської речовини, знизити рівень побічних реакцій від його застосування та розширити фармакотерапевтичний арсенал вітчизняних ефективних нейропротективних препаратів [5].

Враховуючи це, співробітники кафедри технології ліків Запорізького державного медичного університету на підставі комплексних фізико-хімічних, фармакотехнологічних, реологічних і біофармацевтичних досліджень запропонували раціональні рецептури та технології двох нових м'яких аплікаційних лікарських форм вінпоцетину: супозиторіїв ректальних на ліпофільній основі та крему назального на емульсійній основі – для терапії артеріальної гіпертензії II–III стадій із цереброваскулярними ускладненнями, зменшення проявів неврологічних та/або психічних симптомів при різних формах недостатності мозкового кровообігу, наслідків інсульту, транзиторної ішемічної атаки, усіх форм судинної деменції з розладом когнітивних функцій, вертебробазиллярної недостатності внаслідок гіпоплазії та патологічної звивистості брахіоцефальних судин, затримки розумового розвитку в дітей і підлітків, вторинної глаукоми (внаслідок обтурації судин) [6].

Один з обов'язкових фрагментів доклінічного оцінювання препаратів – визначення специфічної активності, що дає змогу встановити їхню ефективність порівняно з фармакотерапевтичними засобами, які традиційно використовують у конкретному сегменті практичної охорони здоров'я, та спрогнозувати клінічну цінність запропонованих експериментальних розробок.

## Мета роботи

Дослідження специфічної активності запропонованих інноваційних аплікаційних лікарських форм вінпоцетину.

## Матеріали і методи дослідження

Як об'єкт доклінічних досліджень використали експериментальну назальну мазь, що містить 0,5 % вінпоцетину, на емульсійній основі та супозиторії ректальні з вінпоцетином 0,01 г на ліпофільному носії, що забезпечують оптимальну фармацевтичну доступність активного фармацевтичного інгредієнта [6,7].

Специфічну активність м'яких аплікаційних лікарських форм вінпоцетину вивчали на моделі ГПМК за типом ішемічного інсульту, який спричиняли шляхом незворотної перев'язки двох загальних сонних артерій лабораторним тваринам. Двобічну перев'язку загальних сонних артерій виконали під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг), застосувавши хірургічний доступ, шляхом виділення сонних артерій і одномоментного накладання на них шовкової лігатури [8].

Лікарські форми вінпоцетину, що досліджували, вводили за схемою: таблетки – внутрішньошлунково за допомогою металевого зонда на 1 % крохмального слизу, свічки – ректально, гель – інтраназально за допомогою шприца-дозатора. Всі лікарські форми вводили лабораторним тваринам у перерахунок на субстанцію вінпоцетину 5 мг/кг один раз на добу протягом усього терміну спостереження одразу після виведення з наркозу [9].

Для оцінювання нейропротективної дії лікарських форм вінпоцетину тварин щодня оглядали, тестували на ступінь прояву неврологічного та когнітивного дефіциту.

Неврологічний дефіцит у тварин визначали за шкалою Stroke-index С. Р. McGrow [10]. Тяжкість стану визначали за сумою балів: до 3 – легкий ступінь, 3–7 балів – середній, 7 балів і вище – тяжкий. Реєстрували парези, паралічі кінцівок, тремор, манежні рухи, птоз, положення на боці, рухливість як прояв неврологічного дефіциту оцінювали за утриманням шурів на обертовому стрижні діаметром 15 см (швидкість – 3 об./хв). Тварин тестували щодня, виставляючи суму балів:

– однобічний напівптоз – 0,5 бала;

– однобічний птоз – 1 бал;

– тремор – 0,5 бала;

– манежні рухи – 0,5 бала;

– парези кінцівок (за кожну кінцівку) – 1 бал;

– параліч кінцівок (за кожну кінцівку) – 2 бали;

– бічне положення – 3 бали;

– нездатність утриматися на обертовому стрижні (3 об./хв) протягом 4 хв – 3 бали.

Як референтний препарат використали таблетки вінпоцетину 5 мг (Астрафарм, Україна), що досить давно й ефективно застосовують у неврологічній і кардіологічній практиці.

## Результати

Результати впливу лікарських форм вінпоцетину на виживаність і неврологічний дефіцит лабораторних тварин із ГПМК наведено в таблиці 1.

У таблиці 2 наведено результати орієнтовно-дослідницької активності тварин із ГПМК після призначення лікарських форм вінпоцетину.

Показники, що отримали в результаті оцінювання когнітивного дефіциту лабораторних тварин на тлі використання лікарських форм із вінпоцетином, наведено в таблиці 3.

У таблицях 4–7 наведено результати біохімічних досліджень тканин головного мозку тварин із ГПМК після використання крему назального та супозиторіїв ректальних із вінпоцетином.

## Обговорення

Двобічна перев'язка загальних сонних артерій спричиняла тяжкі неврологічні зміни у тварин: паралічі, парези, птоз – із максимальними проявами на 4 добу (19,1 бала), що відповідає тяжкому ступеню неврологічної симптоматики. На 4 добу в контрольній групі вижили 30 % тварин.

**Таблиця 1.** Вплив лікарських форм вінпоцетину на виживаність і виникнення неврологічного дефіциту в тварин у різні терміни після ГПМК (M ± m)

Група тварин	Середній бал за шкалою С. Р. McGrow, 4 доба	Співвідношення прооперованих тварин і тих, що вижили, на 4 добу, %
Інтактна (хибнооперовані)	0 ± 0	(7/7) 100
ГПМК – контроль	19,1 ± 1,88 <sup>Δ</sup>	(18/6) 30 <sup>Δ</sup>
ГПМК – крем назальний вінпоцетину	7,79 ± 1,63 <sup>Δ*</sup>	(10/6) 60*
ГПМК – супозиторії ректальні вінпоцетину	10,11 ± 2,87 <sup>Δ*</sup>	(10/5) 50*
ГПМК – таблетки вінпоцетину	11,65 ± 2,65 <sup>Δ*</sup>	(10/5) 50*

Δ: p < 0,05 щодо інтакту; \*: p < 0,05 щодо контролю.

**Таблиця 2.** Вплив лікарських форм вінпоцетину на орієнтовно-дослідницьку активність тварин із ГПМК

Групи тварин	Кількість горизонтальних рухів (за 3 хв)	Кількість вертикальних рухів (за 3 хв)	Кількість заглядань (за 3 хв)
Інтактна (хибнооперовані)	45,5 ± 2,31	15,20 ± 0,76	5,40 ± 0,76
ГПМК – контроль	10,1 ± 2,8 <sup>Δ</sup>	1,30 ± 0,61 <sup>Δ</sup>	0,64 ± 0,04 <sup>Δ</sup>
ГПМК – крем назальний вінпоцетину	22,9 ± 2,8*	6,7 ± 0,8*	3,20 ± 0,15*
ГПМК – супозиторії ректальні вінпоцетину	19,7 ± 2,7 <sup>*Δ</sup>	4,8 ± 1,4 <sup>*Δ</sup>	2,00 ± 0,05*
ГПМК – таблетки вінпоцетину	15,1 ± 2,1 <sup>*Δ</sup>	3,4 ± 1,1 <sup>*Δ</sup>	1,20 ± 0,05 <sup>Δ</sup>

Δ: p < 0,05 щодо інтакту; \*: p < 0,05 щодо контролю.

**Таблиця 3.** Вплив лікарських форм вінпоцетину на збереження умовного рефлексу тварин із ГПМК

Групи тварин	Латентний період у тесті УРПУ до навчання, с	Латентний період у тесті УРПУ через 24 год після навчання, с	Кількість дослідних тварин, %
ГПМК – крем назальний вінпоцетину	4,71 ± 0,63*	44,70 ± 4,24 <sup>Δ*</sup>	50
ГПМК – супозиторії ректальні вінпоцетину	6,15 ± 0,46	24,30 ± 4,48 <sup>Δ*</sup>	25
ГПМК – таблетки вінпоцетину	6,12 ± 0,27	19,11 ± 3,12 <sup>*Δ</sup>	20
ГПМК – контроль	7,11 ± 0,35	16,11 ± 3,24 <sup>Δ</sup>	0
Інтактна (хибнооперовані)	9,88 ± 1,08	172,20 ± 2,76	100

Δ: p < 0,05 щодо інтакту; \*: p < 0,05 щодо контролю; УРПУ: умовна реакція пасивного уникнення.

**Таблиця 4.** Вплив лікарських форм вінпоцетину на показники оксидативного стресу (продукти ОМБ) в мозку щурів на 5 добу ГПМК (M ± m)

Група тварин	Продукти ОМБ, о. п./мг білка	
	АФГ (270 нм)	КФГ (363 нм)
Інтактна	0,81 ± 0,03	0,58 ± 0,01
ГПМК, контроль	5,87 ± 0,11 <sup>Δ</sup>	4,11 ± 0,09 <sup>Δ</sup>
ГПМК – крем назальний вінпоцетину	4,04 ± 0,33 <sup>*Δ</sup>	2,15 ± 0,03 <sup>*Δ</sup>
ГПМК – таблетки вінпоцетину	5,12 ± 0,17 <sup>Δ</sup>	3,17 ± 0,08 <sup>*Δ</sup>
ГПМК – супозиторії ректальні вінпоцетину	4,55 ± 0,12 <sup>*Δ</sup>	3,14 ± 0,08 <sup>*Δ</sup>

Δ: p < 0,05 щодо інтакту; \*: p < 0,05 щодо контролю.

**Таблиця 5.** Вплив лікарських форм вінпоцетину на показники антиоксидантної системи в мозку щурів на 5 добу ГПМК (M ± m)

Група тварин	СОД, у. о./мг білка/хв	Каталаза, мкат/мг білка/хв	ГПР, мкмоль/мг білка/хв
Інтактна	287,4 ± 12,6	7,81 ± 0,71	77,4 ± 3,8
ГПМК – контроль	110,3 ± 18,1 <sup>Δ</sup>	3,06 ± 0,46 <sup>Δ</sup>	34,10 ± 3,54 <sup>Δ</sup>
ГПМК – крем назальний вінпоцетину	197,4 ± 8,0*	5,20 ± 0,21*	36,00 ± 3,22 <sup>Δ</sup>
ГПМК – таблетки вінпоцетину	143,5 ± 9,1*	4,64 ± 0,40 <sup>*Δ</sup>	34,10 ± 4,11 <sup>Δ</sup>
ГПМК – супозиторії ректальні вінпоцетину	121,60 ± 7,87 <sup>Δ</sup>	4,32 ± 0,31 <sup>*Δ</sup>	32,04 ± 3,76 <sup>Δ</sup>

Δ: p < 0,05 щодо інтакту; \*: p < 0,05 щодо контролю.

**Таблиця 6.** Вплив лікарських форм вінпоцетину на утримання аденілових нуклеотидів у головному мозку тварин із ГПМК (M ± m)

Групи тварин	АТФ, мкмоль/г тканини	АДФ, мкмоль/г тканини	АМФ, мкмоль/г тканини
Інтактна	2,90 ± 0,15	0,42 ± 0,03	0,14 ± 0,01
ГПМК – контроль	1,71 ± 0,05 <sup>Δ</sup>	0,31 ± 0,01 <sup>Δ</sup>	0,24 ± 0,03 <sup>Δ</sup>
ГПМК – крем назальний вінпоцетину	2,00 ± 0,07 <sup>*Δ</sup>	0,37 ± 0,01 <sup>*Δ</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>*Δ</sup>
ГПМК – супозиторії ректальні вінпоцетину	1,93 ± 0,06 <sup>*Δ</sup>	0,37 ± 0,02 <sup>*Δ</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>*Δ</sup>
ГПМК – таблетки вінпоцетину	1,88 ± 0,07 <sup>*Δ</sup>	0,35 ± 0,04 <sup>Δ</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>Δ</sup>

Δ: p < 0,05 щодо інтакту; \*: p < 0,05 щодо контролю.

**Таблиця 7.** Вплив лікарських форм вінпоцетину на показники окиснювальних процесів у головному мозку тварин із ГПМК (M ± m)

Групи тварин	Малат, мкмоль/г тканини	Ізоцитрат, мкмоль/г тканини	Лактат, мкмоль/г тканини	СДГ, мкмоль/мг/хв
Інтактна	0,44 ± 0,02	0,46 ± 0,03	2,10 ± 0,10	6,77 ± 0,32
ГПМК – контроль	0,17 ± 0,01 <sup>Δ</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>Δ</sup>	4,70 ± 0,17 <sup>Δ</sup>	2,55 ± 0,10 <sup>Δ</sup>
ГПМК – крем назальний вінпоцетину	0,34 ± 0,01*	0,44 ± 0,01*	2,89 ± 0,11*	5,88 ± 0,21*
ГПМК – супозиторії ректальні вінпоцетину	0,31 ± 0,02*	0,39 ± 0,01*	2,91 ± 0,21*	5,12 ± 0,32*
ГПМК – таблетки вінпоцетину	0,27 ± 0,02 <sup>*Δ</sup>	0,34 ± 0,01*	3,10 ± 0,31 <sup>*Δ</sup>	4,63 ± 0,18 <sup>*Δ</sup>

Δ: p < 0,05 щодо інтакту; \*: p < 0,05 щодо контролю.

Введення шурам із ГПМК лікарських форм вінпоцетину 1 раз на добу протягом усього терміну спостереження мало нейропротективний ефект, що визначили за зниженням летальності та неврологічних порушень. Введення крему, таблеток і ректальних супозиторіїв вінпоцетину гальмувало розвиток неврологічного дефіциту, прискорювало відновлення неврологічного статусу та знижувало загибель тварин із двобічною перешкодою загальних сонних артерій (ішемічний інсульт), а отже можна зробити висновок про їхній нейропротективний ефект. Істотно вирізнявся інтраназальний шлях введення препарату, завдяки якому досягли майже втричі кращого запобігання виникненню неврологічної симптоматики на 4 добу експерименту, зменшення летальності на 30 % порівняно з групою нелікованих тварин. За цими показниками інтраназальне введення вінпоцетину перевершувало внутрішньошлунковий і ректальний шляхи.

Така нейропротективна дія вінпоцетину та його нових лікарських форм пояснюється через механізм вазодилатації та селективного покращення мозкового кровообігу в умовах ішемії та гіпоксії. Вазодилатаційний ефект вінпоцетину не супроводжується ефектом «обкрадання». Вінпоцетин може перерозподіляти та посилювати кровообіг до синдром-пов'язаних (пошкоджених) ділянок головного мозку без значущого «обкрадання» інтактних (здорових) ділянок. Вінпоцетин вибірково розширює судини мозку, і цей ефект може бути підґрунтям для успішного лікування судинних патологій мозку, включаючи інсульт.

Моделювання ГПМК призводило до пригнічення орієнтовно-дослідницької активності тварин. Ці зміни характеризувалися істотним зниженням кількості горизонтальних і вертикальних рухів, «заглядань». Призначення всіх препаратів, що досліджували, призводило до підвищення рухової активності. Введення лікарських форм вінпоцетину запобігало виникненню когнітивно-мнестичних розладів після ГПМК. Такий висновок зробили, виявивши посилення дослідницької активності тварин (кількість заглядань в отвори в підлозі) і збільшення латентного періоду умовної реакції пасивного уникнення (табл. 2). Найвищий результат зафіксували у групі тварин із ГПМК, яким вінпоцетин вводили курсом інтраназально.

Визначили, що ГПМК спричиняв істотні зміни окисної модифікації білка в головному мозку. Окиснювальна модифікація білкових молекул, своєю чергою, призводить до порушення здатності мембран генерувати, проводити та відтворювати нервовий імпульс, порушень рецепторних, медіаторних, секреторних і метаболічних систем нейрона, а отже до формування стійкого когнітивного дефіциту.

Введення тваринам з оклюзією загальних сонних артерій лікарських форм вінпоцетину призводило до підвищення активності каталази і супероксиддисмутази (СОД) в головному мозку, але не мало значущого впливу на активність ГПР.

У групах тварин, які протягом 4 діб отримували препарати вінпоцетину, достовірно знижувалися маркери оксидативного стресу – АФГ і КФГ. Найбільша активність властива лікарській формі вінпоцетину, яку вводили інтраназально протягом 4 діб.

Раніше повідомляли, що вінпоцетин функціонує як потужний антиоксидант і запобігає пошкодженню клітин мозку циркулюючими радикалами жирних кислот. У цьому дослі-

дженні вперше виявили здатність вінпоцетину реактивувати антиоксидантні ферменти – СОД і каталазу. Антиоксидантні властивості вінпоцетину мають важливе значення для реалізації нейропротективного ефекту, оскільки в пацієнтів із судинними захворюваннями мозку при ішемічному пошкодженні нейронів вільні радикали відіграють провідну роль, і нейтралізація їх антиоксидантами, зокрема сполуками індолу, включаючи вінпоцетин, може мінімізувати загибель клітин.

Встановили, що моделювання ГПМК призводить до розвитку ішемічного порушення енергетичного обміну. Так, у головному мозку тварин із ГПМК порівняно з інтактною групою зареєстрували зниження рівня АТФ, аденозиндифосфату (АДФ), а також підвищення аденозинмонофосфату (АМФ). Зниження енергетичних ресурсів головного мозку відбувалося на тлі дискоординації циклу Кребса, про що свідчить зниження малату, ізоцитрату, пригнічення активності сукцинатдегідрогенази (СДГ). Спостерігали компенсаторну активацію гліколізу, підтверджену збільшенням лактату в тканинах мозку.

Лікарським формам вінпоцетину властивий енерготропний вплив, що виявили за збільшенням рівня макроергічних фосфатів. Призначення вінпоцетину у формі свічок, гелю та таблеток сприяло зменшенню вираженості пригнічення окиснення в циклі Кребса (підвищення рівня малату й, особливо, ізоцитрату, а також збільшення активності СДГ). Очевидно, вінпоцетин має прямий позитивний вплив на трикарбоніві ділянки циклу Кребса та підвищення продукції АТФ.

Результати дослідження не суперечать відомостям інших авторів про те, що вінпоцетин активізує дефіцитний обмін речовин і збільшує енергетичну ємність мозку шляхом поліпшення утилізації глюкози, кисню і темпів синтезу АТФ. Найбільшу енерготропну активність виявили в назального крему вінпоцетину, що вводили інтраназально протягом 4 діб.

## Висновки

1. На моделі ГПМК за типом ішемічного інсульту в білих шурів виявили, що аплікаційні м'які лікарські форми вінпоцетину (ректальні супозиторії 0,01 г на ліпофільній основі та назальний крем на емульсійній основі 0,5 %) мають виражену нейропротективну активність.

2. Ефективність вінпоцетину в ректальній (супозиторії) та назальній (крем) формах при експериментальній терапії гострого порушення мозкового кровообігу достовірно перевищує таку при його традиційному пероральному таблетованому використанні.

3. Дослідження, що здійснили, підтвердили високу нейропротективну активність аплікаційних лікарських форм вінпоцетину: інтраназального крему емульсійного та ректальних супозиторіїв, – що за силою специфічного ефекту переважають пероральний референс-препарат. Результати підтверджують їхню перспективність як засобів первинної нейропротекції в комплексній терапії ГПМК.

**Перспективи подальших досліджень** полягають у продовженні доклінічних досліджень м'яких аплікаційних ректальної та назальної лікарських форм нейропротективної дії з вінпоцетином.

**Фінансування**

Дослідження виконане в рамках плану науково-дослідних робіт Запорізького державного медичного університету «Дослідження біофармацевтичних, фармакокінетичних і реологічних властивостей аплікаційних лікарських форм з речовинами різної фармакологічної дії», держреєстрація № 0112U005635.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

**Conflicts of interest:** authors have no conflict of interest.

**Відомості про авторів:**

Гладышев В. В., д-р фарм. наук, професор, зав. каф. технології ліків, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0001-5935-4856](https://orcid.org/0000-0001-5935-4856)

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

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

Харалінова О. Б., канд. мед. наук, науковий співробітник, НДІ медико-біологічних проблем, Дніпровський державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0002-6854-5539](https://orcid.org/0000-0002-6854-5539)

Курінний А. В., канд. фарм. наук, доцент каф. технології ліків, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0001-8403-4504](https://orcid.org/0000-0001-8403-4504)

Гнітько І. В., канд. фарм. наук, доцент каф. фармації, виробництва та технологій, Східноукраїнський національний університет імені Володимира Даля, м. Северодонецьк, Україна.

ORCID ID: [0000-0002-0668-316X](https://orcid.org/0000-0002-0668-316X)

Пухальська І. О., канд. фарм. наук, доцент каф. технології ліків, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0003-4370-6604](https://orcid.org/0000-0003-4370-6604)

Гладышева С. А., канд. фарм. наук, асистент каф. управління і економіки фармації та фармацевтичної технології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0003-4595-9445](https://orcid.org/0000-0003-4595-9445)

**Information about authors:**

Hladyshev V. V., PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Medicines Technology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

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

Kharaliova O. B., PhD, Research Worker, Research Institute of Medical and Biological Problems, Dnipro State Medical University, Ukraine.

Kurynnyi A. V., PhD, Associate Professor of the Department of Medicines Technology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Hnitko I. V., PhD, Associate Professor of the Department of Pharmacy, Production and Technology, Volodymyr Dahl East Ukrainian National University, Sievierodonetsk, Ukraine.

Pukhalska I. O., PhD, Associate professor of the Department of Medicines Technology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Hladysheva S. A., PhD, Assistant of the Department of Pharmacy Management and Economics, and Pharmaceutical Technology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

**Список літератури**

- [1] Cerebral Vascular Disease and Neurovascular Injury in Ischemic Stroke / X. Hu, T. M. De Silva, J. Chen, F. M. Faraci. *Circulation research*. 2017. Vol. 120, Iss. 3. P. 449-471. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308427>
- [2] Lau W. L., Huisa, B. N., Fisher M. The Cerebrovascular-Chronic Kidney Disease Connection: Perspectives and Mechanisms. *Translational Stroke Research*. 2017. Vol. 8, Iss. 1. P. 67-76. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308427>
- [3] Review on Vinpocetine / A. Dubey, N. Kumar, A. Mishra et al. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*. 2020. Vol. 11, Iss. 5. P. 6590-6597. [http://www.ijplsjournal.com/issues\\_PDF\\_files/Archive-2020/May-2020/2.pdf](http://www.ijplsjournal.com/issues_PDF_files/Archive-2020/May-2020/2.pdf)
- [4] Vinpocetine protects against the development of experimental abdominal aortic aneurysms / C. Zhang, C. G. Hsu, A. Mohan et al.

*Clinical science*. 2020. Vol. 134, Iss. 22. P. 2959-2976. <https://doi.org/10.1042/CS20201057>

- [5] Кечин І. Л., Гладышев В. В., Пухальська І. О. Порівняльна фармакодинаміка каптоприлу при інтраназальному й ентэральному шляхах введення при неускладнених гіпертензивних кризах на амбулаторному етапі лікування. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2021. Т. 14, № 1. 103-108. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2021.1.226857>
- [6] Nagornaya N. A., Gladyshev V. V., Burlaka B. S. Study of consistent properties of vinpocetine intranasal dosage form. *Запорожский медицинский журнал*. 2014. № 5. С. 97-100. <https://doi.org/10.14739/2310-1210.2014.5.29149>
- [7] О влиянии вида носителя и поверхностно-активных веществ на высвобождаемость винпоцетина из суппозитория / Н. А. Нагорная, В. В. Гладышев, В. В. Нагорный, Б. С. Бурлака. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2013. № 2. С. 30-32.
- [8] Доклиническое изучение специфической активности потенциальных лекарственных средств первичной и вторичной нейропротекции. Методические рекомендации / И. С. Чекман, И. Ф. Беленичев, Е. А. Нагорная и др. Киев : ООО Издательство «Юстон», 2016. 82 с.
- [9] Рациональная нейропротекция / И. Ф. Беленичев, В. И. Черний, Ю. М. Колесник и др. Донецк : Издатель Заславский А. Ю., 2009. 262 с.
- [10] Стефанов А. В. Доклиническое исследования лекарственных средств (методические рекомендации). Киев : Авиценна, 2002. 586 с.

**References**

- [1] Hu, X., De Silva, T. M., Chen, J., & Faraci, F. M. (2017). Cerebral Vascular Disease and Neurovascular Injury in Ischemic Stroke. *Circulation research*, 120(3), 449-471. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308427>
- [2] Lau, W. L., Huisa, B. N., & Fisher, M. (2017, February 1). The Cerebrovascular-Chronic Kidney Disease Connection: Perspectives and Mechanisms. *Translational Stroke Research*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/s12975-016-0499-x>
- [3] Dubey, A., Kumar, N., Mishra, A., Singh, Y., & Tiwari, M. (2020). Review on Vinpocetine. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, 11(5), 6590-6597. Retrieved from [http://www.ijplsjournal.com/issues\\_PDF\\_files/Archive-2020/May-2020/2.pdf](http://www.ijplsjournal.com/issues_PDF_files/Archive-2020/May-2020/2.pdf)
- [4] Zhang, C., Hsu, C. G., Mohan, A., Shi, H., Li, D., & Yan, C. (2020). Vinpocetine protects against the development of experimental abdominal aortic aneurysms. *Clinical science*, 134(22), 2959-2976. <https://doi.org/10.1042/CS20201057>
- [5] Kechyn, I. L., Hladyshev, V. V., & Pukhalska, I. O. (2021). Porivnialna farmakodynamika kaptoprylu pry intranazalnomu y enteralnomu shliakhakh vvedennia pry neuskkladnenykh hipertenzynykh kryzhakh na ambulatornomu etapi likuvannia [Comparative pharmacodynamics of intranasal and enteral administration of captopril for uncomplicated hypertensive crises]. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*, 14(1), 103-108. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2021.1.226857>
- [6] Nagornaya, N. A., Gladyshev, V. V., & Burlaka, B. S. (2014). Study of vinpocetine intranasal dosage form consistence properties. *Zaporozhye Medical Journal*, (5), 97-100. <https://doi.org/10.14739/2310-1210.2014.5.29149>
- [7] Nagornaya, N. A., Gladyshev, V. V., Nagorniy, V. V., & Burlaka, B. S. (2013). O vliyaniy vida nositelya i poverkhnostno-aktivnykh veshchestv na vysvobozhdaemost' vintpotsetina iz suppozitoriev [About influence of the kind of the carrier and surfactants on release vinpocetin from suppositories]. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*, (2), 30-32. [in Russian].
- [8] Chekman, I. S., Belenichev, I. F., Nagornaya, E. A., Gorchakova, N. A., Luk'yanchuk, V. D., Bukhtiyarova N. V., & Gorbachev S. V. (2016). *Doklinicheskoe izuchenie spetsificheskoi aktivnosti potentsial'nykh lekarstvennykh sredstv pervichnoi i vtorichnoi neuroproteksii* [Pre-clinical study of the specific activity of potential drugs for primary and secondary neuroprotection: guidelines]. Kiev : ООО Izdatel'stvo "Yuston". [in Russian].
- [9] Belenichev, I. F., Chernii, V. I., Kolesnik, Yu. M., Pavlov, S. V., Andronova, I. A., Abramov, A. V., Ostrovaya, T. V., Bukhtiyarova, N. V., & Kucherenko, L. I. (2009). *Ratsionalnaia neuroproteksiia* [Rational neuroprotection]. Dotetsk: Izdatel Zaslavskii A. Yu. [in Russian].
- [10] Stephanov, A. V. (2002). *Doklinicheskie issledovaniia lekarstvennykh sredstv* (metodicheskie rekomendatsii) [Preclinical studies of drugs (guidelines)]. Kiev: Avitsenna [in Russian].





# Результати визначення показників морфологічного складу крові тварин та окремі біохімічні показники під час використання потенційного препарату з сумішшю двох активних сполук (4-((5-(децилтіо)-4-метил-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну та 5-(2-фторфеніл)-4-((4-бромфеніл)іліден)аміно-1,2,4-тріазол-3-тіолу) в олії насіння розторопші

М. В. Оглобліна<sup>1</sup>, I. В. Бушуєва<sup>2</sup>, В. В. Парченко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Чорноморський національний університет імені Петра Могили, м. Миколаїв, Україна, <sup>2</sup>Запорізький державний медичний 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

Впровадження в медичну і ветеринарну практику нових вітчизняних високоефективних і безпечних лікарських засобів – надважливе завдання сучасної фармацевтичної науки. Продовження пошуку та здійснення досліджень з доведення біологічної активності похідних 1,2,4-тріазолу є перспективними напрямками у цій галузі. Відомо, що такі похідні 1,2,4-тріазолу, як 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфолін і 5-(2-фторфеніл)-4-((4-бромфеніл)іліден)аміно-1,2,4-тріазол-3-тіол мають широкий спектр біологічної активності. Інтерес для наступних ґрунтовних досліджень становить саме протимікробна та протигрибкова дії. Для впровадження в медичну і ветеринарну практику новостворених лікарських препаратів для лікування грибкових захворювань шкіри тварин потрібні нові дослідження властивостей цих сполук і їхніх сумішей.

**Мета роботи** – визначення показників морфологічного складу крові тварин та окремих біохімічних показників під час використання потенційного препарату з сумішшю двох активних сполук: 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну та 5-(2-фторфеніл)-4-((4-бромфеніл)іліден)аміно-1,2,4-тріазол-3-тіолу – в олії насіння розторопші.

**Матеріали та методи.** Матеріал для лабораторних досліджень – сироватка та плазма крові, стабілізована шляхом додавання трілону-Б, тканинний біоптат. Показники визначали у здорових і тварин з експериментальною патологією на третю і десятю добу від початку захворювання за загальноприйнятою методикою. Під час роботи у процесі лікування здійснили загальні клінічні дослідження та місцеве обстеження гнійних ран, а також аналіз зразків крові, що взяті від кожної вівці дослідної та контрольної груп, до початку, на третю та десятю добу експерименту. Гнійно-запальний процес спричиняли травмуванням м'яких тканин у ділянці крупа з лівого боку за допомогою спеціально виготовленого шаблону з наступним пошкодженням м'язової тканини ангіотриптором та імплантацією культур аеробно-анаеробної хірургічної інфекції, взятих із підстилки. Утворені рани були завдовжки 10 см, завширшки – 1 см, глибина – 2 см. Через 24 години після індукції експериментального гнійного запалення в овець виявляли характерні клінічні ознаки: загальний стан усіх 12 тварин дещо пригнічений, але апетит нормальний; температура тіла – 38,6–40,3 °С, пульс – 76–82 уд./хв, частота дихальних рухів – 16–18 за хвилину; частота скорочень рубця – 3–6 разів за 2 хвилини. Під час обстеження виявили незначний набряк у ділянці рани та її країв, на її поверхні – мала кількість серозно-кров'янистого ексудату. На 3 добу в усіх 12 овець визначили максимальну маніфестацію клінічних ознак гострого гнійного запалення: загальний стан пригнічений, часткова втрата апетиту, загальна температура – 40,4–40,8 °С, пульс – 75–82 уд./хв, частота дихальних рухів – 18–22 за хвилину; частота скорочень рубця – 3–6 разів за 2 хвилини. Видимі слизові оболонки – блідо-рожевого кольору, під час натискання в ділянці рани спостерігали виділення серозно-гнійного ексудату.

**Результати.** Позитивні зміни клінічного статусу тварин групи дослідження підтверджуються кращими, ніж у контролі, лабораторними показниками крові та тканинного біоптату. Застосування потенційного препарату з сумішшю двох активних сполук (4-((5-(децилтіо)-4-метил-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну та 5-(2-фторфеніл)-4-((4-бромфеніл)іліден)аміно-1,2,4-тріазол-3-тіолу) в олії насіння розторопші призводить до швидшого загоєння гнійних ран порівняно з показниками при використанні лініменту «Ветміко-дерм» (контрольна група). Різниця за площами ранового дефекту на 10–11 добу становила 17,5 %. Клінічні дані підтверджено лабораторними дослідженнями та аналізом ранового біоптату.

**Висновки.** Потенційний препарат із двома сполуками: 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліном і 5-(2-фторфеніл)-4-((4-бромфеніл)іліден)аміно-1,2,4-тріазол-3-тіолом – має виражені фармакокінетичні параметри та є біодоступним.

## ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/263015>

UDC 59:616.15-074:[615.31:547.792+615.322:582.998.1]

DOI: [10.14739/2409-2932.2022.3.263015](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2022.3.263015)

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 283–287

**Key words:** clinical studies, laboratory studies, 4-((5-(decylthio)-4-methyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)methyl)morpholine, 5-(2-fluorophenyl)-4-((4-bromophenyl)ylidene)amino-1,2,4-triazole-3-thiol, a mixture of active compounds.

\*E-mail: [valery999@ukr.net](mailto:valery999@ukr.net)

Received: 16.08.2022 // Revised: 30.08.2022 // Accepted: 07.09.2022

**Ключові слова:** клінічні дослідження, лабораторні дослідження, 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфолін, 5-(2-фторфеніл)-4-((4-бромфеніл)іліден)аміно-1,2,4-тріазол-3-тіол, суміш активних сполук.

**Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2022. Т. 15, № 3(40). С. 283–287**

**The results of determining the indicators of the morphological composition of the blood of animals and individual biochemical indicators using a potential drug with a mixture of two active compounds: 4-((5-(decylthio)-4-methyl-4*H*-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)morpholine and 5-(2-fluorophenyl)-4-((4-bromophenyl)ylidene)amino-1,2,4-triazole-3-thiol in milk thistle seed oil**

M. V. Ohloblina, I. V. Bushuieva, V. V. Parchenko

The introduction of new domestic highly effective and safe medicines into medical and veterinary practice is an important task of modern pharmaceutical science. Continuation of the search and conduct of research to bring the biological activity of 1,2,4-triazole derivatives is one of the promising areas of such activity. At this stage of research, it is known that such 1,2,4-triazole derivatives as 4-((5-(decylthio)-4-methyl-4*H*-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)morpholine and 5-(2-fluorophenyl)-4-((4-bromophenyl)ylidene)amino-1,2,4-triazole-3-thiol have a wide spectrum of biological activity. Interest for further thorough research is precisely the antimicrobial and antifungal effects. The introduction into medical and veterinary practice of newly created drugs for the treatment of fungal diseases on the skin of animals requires further studies of the properties of these compounds and their mixtures.

**The aim** of the work was to determine the indicators of the morphological composition of the blood of animals and individual biochemical indicators when using a preparation with a mixture of two active compounds: 4-((5-(decylthio)-4-methyl-4*H*-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)morpholine and 5-(2-fluorophenyl)-4-((4-bromophenyl)ylidene)amino-1,2,4-triazole-3-thiol in thistle seed oil.

**Materials and methods.** The material for laboratory research was serum and blood plasma, stabilized by adding trilon-B, tissue biopsy. Indicators were determined in healthy animals and experimentally diseased animals on the third and tenth days after the onset of the disease according to the generally accepted method. During the research, in the course of treatment, general clinical examinations and local examinations of purulent wounds were carried out, as well as blood samples taken from each head of the sheep in the experimental and control groups before the beginning and on the third and tenth days of the experiment. The purulent-inflammatory process was caused by injuring the soft tissues in the groin area on the left side, with the help of a specially made template, followed by dilation of the muscle tissue with an angiotrip and implantation of aerobic-anaerobic surgical infection cultures taken from the bed. The resulting wounds had the following dimensions: 10 cm in length, 1 cm in width, and 2 cm in depth. As early as 24 hours after induction of experimental purulent inflammation, characteristic clinical signs appeared in sheep. The general condition of all 12 animals was somewhat depressed, the appetite was normal. The body temperature was in the range of 38.6–40.3 °C, the pulse was 76–82 beats, and the frequency of respiratory movements was 16–18 per minute. The frequency of scar contractions was 3–6 times in 2 minutes. During the examination, slight swelling was also found in the area of the wound and its edges. There was a small amount of serous-bloody exudate on the surface of the wound. On the 3<sup>rd</sup> day, the maximum manifestation of clinical signs of acute purulent inflammation was observed in all 12 sheep. In particular, the general condition of the animals is depressed. A partial loss of appetite was observed. General temperature 40.4–40.8 °C, pulse 75–82 beats, frequency of respiratory movements 18–22 per minute. The frequency of scar contractions was 3–6 times in 2 minutes. Visible mucous membranes are pale pink in color. When pressing on the area of the wound, a serous-purulent exudate was observed.

**Results.** Laboratory indicators of blood and tissue biopsy that are more optimal than in the control group confirm positive changes in the clinical status of the animals in the experimental group. The use of a potential preparation with a mixture of two active compounds: 4-((5-(decylthio)-4-methyl-4*H*-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)morpholine and 5-(2-fluorophenyl)-4-((4-bromophenyl)ylidene)amino-1,2,4-triazole-3-thiol in thistle seed oil leads to faster healing of purulent wounds, in relation to the use of "Vetmikoderm" liniment (control group). The difference in the areas of the wound defect on the 10–11<sup>th</sup> day was 17.5 %. Clinical studies were confirmed by laboratory studies and wound biopsies.

**Conclusions.** The preparation with two compounds: 4-((5-(decylthio)-4-methyl-4*H*-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)morpholine and 5-(2-fluorophenyl)-4-((4-bromophenyl)ylidene)amino-1,2,4-triazole-3-thiol had pronounced pharmacokinetic parameters and was bioavailable.

**Key words:** clinical studies, laboratory studies, 4-((5-(decylthio)-4-methyl-4*H*-1,2,4-triazole-3-yl)methyl)morpholine, 5-(2-fluorophenyl)-4-((4-bromophenyl)ylidene)amino-1,2,4-triazole-3-thiol, a mixture of active compounds.

**Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 283–287**

Впровадження в медичну і ветеринарну практику нових вітчизняних високоефективних і безпечних лікарських засобів – надзвичайне завдання сучасної фармацевтичної науки. Продовження пошуку та здійснення досліджень з доведення біологічної активності похідних 1,2,4-тріазолу є перспективними напрямками у цій галузі. Відомо, що такі похідні 1,2,4-тріазолу, як 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфолін і 5-(2-фторфеніл)-4-((4-бромфеніл)іліден)аміно-1,2,4-тріазол-3-тіол мають широкий спектр біологічної активності. Інтерес для наступних ґрунтовних досліджень становить саме

протимікробна та протигрибкова дії. Для впровадження в медичну і ветеринарну практику новостворених лікарських препаратів для лікування грибкових захворювань шкіри тварин потрібні нові дослідження властивостей цих сполук і їхніх сумішей [1–9].

### Мета роботи

Визначення показників морфологічного складу крові тварин та окремих біохімічних показників під час використання потенційного препарату з сумішшю двох активних сполук: 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)

метил)морфоліну та 5-(2-фторфеніл)-4-((4-бромфеніл)ліден)аміно-1,2,4-тріазол-3-тіолу – в олії насіння розторопші.

## Матеріали і методи дослідження

Матеріал для лабораторних досліджень – сироватка та плазма крові, стабілізована шляхом додавання трилону-Б, тканинний біоптат. Показники визначали у здорових і тварин з експериментальною патологією на третю і десятю добу від початку захворювання за загальноприйнятою методикою. Під час роботи у процесі лікування здійснили загальні клінічні дослідження та місцеве обстеження гнійних ран, а також аналіз зразків крові, що взяті від кожної вівці дослідної та контрольної груп, до початку, на третю та десятю добу експерименту.

Гнійно-запальний процес спричиняли травмуванням м'язих тканин у ділянці крупа з лівого боку за допомогою спеціально виготовленого шаблону з наступним пошкодженням м'язової тканини ангіотриптором та імплантацією культур аеробно-анаеробної хірургічної інфекції, взятих із підстилки. Утворені рани були завдовжки 10 см, завширшки – 1 см, глибина – 2 см. Через 24 години після індукції експериментального гнійного запалення в овець виявляли характерні клінічні ознаки: загальний стан усіх 12 тварин дещо пригнічений, але апетит нормальний; температура тіла – 38,6–40,3 °С, пульс – 76–82 уд./хв, частота дихальних рухів – 16–18 за хвилину; частота скорочень рубця – 3–6 разів за 2 хвилини. Під час обстеження

виявили незначний набряк у ділянці рани та її країв, на її поверхні – мала кількість серозно-кров'янистого ексудату. На 3 добу в усіх 12 овець визначили максимальну маніфестацію клінічних ознак гострого гнійного запалення: загальний стан пригнічений, часткова втрата апетиту, загальна температура – 40,4–40,8 °С, пульс – 75–82 уд./хв, частота дихальних рухів – 18–22 за хвилину; частота скорочень рубця – 3–6 разів за 2 хвилини. Видимі слизові оболонки – блідо-рожевого кольору, під час натискання в ділянці рани спостерігали виділення серозно-гнійного ексудату (згідно з рекомендаціями «Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів» за ред. І. Я. Коцюмбаса. Львів: Тріада плюс, 2006. 360 с.).

## Результати

Під час дослідження визначали показники морфологічного (обрахунок кількості еритроцитів, лейкоцитів, виведення лейкограми) складу крові й окремі біохімічні показники (рівні гемоглобіну, загального білка, білкових фракцій, малонового діальдегіду, ізольованих подвійних зв'язків, гідроперекисів ліпідів, дієнових, трієнових і оксодієнових кон'югатів, міді, заліза, церулоплазміну, каталази, супероксиддисмутази, загальних ліпідів, загального холестерину, загальної окиснювальної активності плазми, лужної фосфатази) (табл. 1).

На 10 добу запального процесу (7 доба лікування) спостерігали поступове покращення загального стану овець обох груп. Загальний стан тварин дослідної групи

Таблиця 1. Показники морфологічного складу крові й окремі біохімічні показники

Показник, одиниці вимірювання	Клінічно здорові тварини (клінічна норма)	Перебіг запалення, доба	
		Третя	Десята
<b>Гематологія</b>			
Гемоглобін, г/л (дослідна група)	105,22 ± 2,85	79,33 ± 8,35	88,68 ± 2,52
Гемоглобін, г/л (контрольна група)	105,21 ± 2,74	73,22 ± 2,74	79,88 ± 6,45
Еритроцити, г/л (дослідна група)	7,85 ± 0,27	6,72 ± 0,35	7,52 ± 0,14
Еритроцити, г/л (контрольна група)	7,85 ± 0,27	6,77 ± 0,45	6,74 ± 0,33
Лейкоцити, г/л (дослідна група)	8,37 ± 0,33	16,44 ± 1,65	17,16 ± 1,45
Лейкоцити, г/л (контрольна група)	8,37 ± 0,32	19,33 ± 1,87	18,65 ± 1,15
<b>Загальний білок і білкові фракції</b>			
Загальний білок, г/л (дослідна група)	64,67 ± 1,12	60,12 ± 2,21	67,42 ± 2,13
Загальний білок, г/л (контрольна група)	64,67 ± 1,12	65,77 ± 1,03	72,21 ± 1,27
Альбуміни, % (дослідна група)	38,65 ± 1,92	30,72 ± 1,47	36,35 ± 1,56
Альбуміни, % (контрольна група)	38,65 ± 1,91	33,85 ± 1,12	40,23 ± 1,44
α-глобуліни, % (дослідна група)	12,04 ± 0,62	14,25 ± 1,11	12,74 ± 1,12
α-глобуліни, % (контрольна група)	12,05 ± 0,82	11,23 ± 0,65	10,74 ± 1,06
β-глобулін, % (дослідна група)	6,05 ± 0,74	23,44 ± 2,23	13,05 ± 0,74
β-глобулін, % (контрольна група)	6,05 ± 0,72	26,12 ± 0,54	12,52 ± 0,63
γ-глобулін, % (дослідна група)	43,23 ± 1,55	31,21 ± 2,23	37,66 ± 1,45
γ-глобулін, % (контрольна група)	43,25 ± 1,51	28,56 ± 2,13	35,42 ± 1,09

## Продовження таблиці 1.

Показник, одиниці вимірювання	Клінічно здорові тварини (клінічна норма)	Перебіг запалення, доба	
		Третя	Десята
<b>ПОЛ-АОЗ</b>			
СОД, од. акт. (дослідна група)	1,25 ± 0,12	2,33 ± 0,26	3,06 ± 0,33
СОД, од. акт. (контрольна група)	1,25 ± 0,13	1,26 ± 0,21	1,26 ± 0,37
Каталаза, мккат/л (дослідна група)	73,22 ± 7,03	47,04 ± 8,75	56,38 ± 2,24
Каталаза, мккат/л (контрольна група)	73,22 ± 7,07	51,96 ± 11,02	41,74 ± 4,56
Гідроперекиси ліпідів, у. о./мл, (дослідна група)	3,88 ± 0,44	11,95 ± 2,21	5,39 ± 1,88
Гідроперекиси ліпідів, у. о./мл, (контрольна група)	3,88 ± 0,52	5,33 ± 1,12	2,69 ± 1,55
Дієнові кон'югати, у. о./мл (дослідна група)	2,07 ± 0,29	5,77 ± 1,52	5,46 ± 0,33
Дієнові кон'югати, у. о./мл (контрольна група)	2,07 ± 0,28	5,32 ± 0,55	5,12 ± 0,34
Малоновий діальдегід, мкмоль/л (дослідна група)	1,98 ± 0,08	3,10 ± 0,11	3,20 ± 0,21
Малоновий діальдегід, мкмоль/л (контрольна група)	1,98 ± 0,06	3,07 ± 0,04	3,03 ± 0,07
Загальні ліпіди, г/л (дослідна група)	0,93 ± 0,07	1,78 ± 0,54	0,77 ± 0,12
Загальні ліпіди, г/л (контрольна група)	0,93 ± 0,06	1,22 ± 0,23	1,07 ± 0,13
Загальна окиснювальна активність плазми, % (дослідна група)	40,46 ± 1,55	50,46 ± 2,44	52,43 ± 3,32
Загальна окиснювальна активність плазми, % (контрольна група)	40,46 ± 1,46	46,46 ± 2,37	55,28 ± 1,71

задовільний, віці активно вживали корм. Температура тіла – 38,8–39,6 °С, пульс – 73–77 уд./хв, частота дихальних рухів – 16–17 за хвилину. Розміри рани зменшилися до 11,70 ± 0,75 см<sup>2</sup>, її поверхня присохла. При руйнуванні висохлих кірочок виділялася незначна кількість серозно-кров'янистого ексудату. Рана заповнена зрілими здоровими грануляціями. Загальний стан тварин контрольної групи задовільний, віці активно вживали корм. Температура тіла – 38,5–39,2 °С, пульс – 72–74 уд./хв, частота дихальних рухів – 15–16 за хвилину. Розміри рани зменшилися до 14,00 ± 1,02 см<sup>2</sup>, її поверхня присохла. При руйнуванні висохлих кірочок виділявся серозно-кров'янистий ексудат. Рана заповнена частково здоровими грануляціями.

## Обговорення

Встановлення показників морфологічного складу крові тварин та окремих біохімічних показників у разі використання потенційного препарату з сумішшю двох активних сполук: (4-((5-(децилтіо)-4-метил-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну та 5-(2-фторфеніл)-4-((4-бромфеніл)іліден)аміно-1,2,4-тріазол-3-тіолу) – в олії насіння розторопші довело позитивні зміни клінічного статусу тварин дослідної групи. Це підтверджується кращими, ніж у контрольній групі, лабораторними показниками крові та тканинного біоптату.

## Висновки

1. Застосування потенційного препарату з сумішшю двох активних сполук (4-((5-(децилтіо)-4-метил-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну та 5-(2-фторфеніл)-4-((4-бромфеніл)іліден)аміно-1,2,4-трі-

азол-3-тіолу) в олії насіння розторопші призводить до швидшого загоєння гнійних ран порівняно з показниками при використанні лініменту «Ветмікодерм» (контрольна група). Різниця за площами ранового дефекту на 10–11 добу становила 17,5 %. Клінічні дані підтверджено лабораторними дослідженнями та аналізом ранового біоптату.

2. Потенційний препарат із двома сполуками: 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліном і 5-(2-фторфеніл)-4-((4-бромфеніл)іліден)аміно-1,2,4-тріазол-3-тіолом – має виражені фармакокінетичні параметри та є біодоступним.

**Перспективи подальших досліджень.** Результати роботи дали змогу спланувати наступні дослідження ембріо-летального, фето- та ембріотоксичного ефектів суміші 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)метил)морфоліну та 5-(2-фторфеніл)-4-((4-бромфеніл)іліден)аміно-1,2,4-тріазол-3-тіолу в олії насіння розторопші у постнатальному періоді.

## Фінансування

Дослідження здійснене у рамках ініціативної науково-дослідної роботи кафедри фармації, фармакології, медичної, біоорганічної та біологічної хімії Медичного інституту Чорноморського національного університету імені Петра Могили.

## Подяка

Автори статті щиро дякують Збройним силам України та редакції наукового журналу за можливість здійснювати дослідження та публікувати їхні результати.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

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

## Відомості про авторів:

Оглобліна М. В., канд. фарм. наук, доцент, зав. каф. фармації, фармакології, медичної, біоорганічної та біологічної хімії, Медичний інститут Чорноморського національного університету імені Петра Могили, м. Миколаїв, Україна.

ORCID ID: [0000-0001-5696-3621](https://orcid.org/0000-0001-5696-3621)

Бушуєва І. В., д-р фарм. наук, професор, зав. каф. управління і економіки фармації та фармацевтичної технології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0002-5336-3900](https://orcid.org/0000-0002-5336-3900)

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

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

## Information about authors:

Ohloblina M. V., PhD, Associate Professor, Head of the Department of Pharmacology, Medical, Bioorganic and Biological Chemistry, Medical Institute of the Petro Mohyla Black Sea National University, Mykolaiv, Ukraine.

Bushuieva I. V., PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Management and Economics of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

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

## Список літератури

- [1] Evaluation of acute and subacute toxicity of oil liniment based on 4-((5-(decylthio)-4-methyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)methyl)morpholine / R. Shcherbina, V. Parchenko, V. Martynyshyn, V. Hunchak. *Ankara Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi*. 2018. Vol. 42, Iss. 1. P. 43-52.
- [2] Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. реком. / за ред. О. В. Стефанова ; Держ. фармакол. центр. Київ, 2001. 527 с.
- [3] Положення про Комітет з питань етики (біоетики) : наказ МОУ України від 19.11.2012 № 1287. URL : <https://ips.ligazakon.net/document/view/MUS19313?an=1>
- [4] Застосування морфоліній 2-[5-(піридин-4-іл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо]ацетату для лікування і профілактики деяких захворювань / І. В. Бушуєва, Л. І. Пархоменко, Є. Г. Книш, О. І. Панасенко. *Запорізький медичний журнал*. 2014. № 2. С. 97-99. <https://doi.org/10.14739/2310-1210.2014.2.25443>
- [5] Застосування препарату «Авесстим» для підвищення ефективності вакцинопрофілактики та вплив препарату на резистентність курчат / І. В. Бушуєва, А. В. Березовський, Є. Г. Книш, О. І. Панасенко. *ScienceRise*. 2014. Т. 4, № 1. С. 94-97. <https://doi.org/10.15587/2313-8416.2014.29279>
- [6] Вивчення впливу морфоліній 2-[5-(піридин-4-іл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо]ацетату на профілактику стресових станів / І. В. Бушуєва, Б. П. Киричко, Є. Г. Книш та ін. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2014. № 2. С. 64-66.
- [7] Пат. 138684, Україна. Спосіб лікування дерматологічних захворювань / В. П. Мартинишин, В. М. Гунчак, О. І. Панасенко та ін. № u201904928 ; заявл. 10.05.2019 ; опубл. 10.12.2019, бюл. № 23/2019. URL: <https://sis.ukrpatent.org/uk/search/detail/1396036/>
- [8] Бушуєва І. В., Книш Є. Г., Панасенко О. І. Дослідження лікувальної ефективності морфоліній 2-[5піридин-4-іл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо]ацетату при хворобах деяких видів тварин. 2014. *ScienceRise*. Т. 3, № 1. С. 100-104. <https://doi.org/10.15587/2313-8416.2014.27998>
- [9] Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів / І. Я. Коцюмбас, О. Г. Малик, І. П. Патерега та ін.; за ред. І. Я. Коцюмбаса. Львів : Тріада плюс, 2006. 360 с.

## References

- [1] Shcherbina, R., Parchenko, V., Martynyshyn, V., & Hunchak, V. (2018). Evaluation of acute and subacute toxicity of oil liniment based on 4-((5-(decylthio)-4-methyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)methyl)morpholine. *Ankara Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi*, 42(1), 43-52.
- [2] Stefanov, O. V. (Ed.). (2001). *Doklinichni doslidzhennya likarskih zasobiv* [Preclinical studies of medicines]. Kyiv: Avitsena. [in Ukrainian].
- [3] *Ministry of Education and Science of Ukraine. (2012, November 19). Polozhennia pro Komitet z pytan etyky (bioetyky)* [Regulations on the Committee on Ethics (Bioethics) (No. 1287)]. <https://ips.ligazakon.net/document/view/MUS19313?an=1>

- [4] Bushuieva, I. V., Parkhomenko, L. I., Knyshe, Ye. H., & Panasenko, O. I. (2014). Zastosuvannia morfolinii 2-[5-(pirydyn-4-il)-1,2,4-triazol-3-iltio]atsetatu dlia likuvannia i profilaktyky deiakykh zakhvoriuvan [Application of the morpholines of 2-[5-(pyridin-4-yl)-1,2,4-triazol-3-ylthio] acetates for the treatment and prevention of some diseases]. *Zaporozhye medical journal*, (2), 97-99. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.14739/2310-1210.2014.2.25443>
- [5] Bushuieva, I. V., Berezovskiy, A. V., Knyshe, Ye. H., & Panasenko, O. I. (2014). Zastosuvannia preparatu "Avesstym" dlia pidvyshchennia efektyvnosti vaktsynoprofilaktyky ta vplyv preparatu na rezystentnist kurchat [Use of the drug "Avastin" to increase the effectiveness of vaccination and the effect of the drug resistance of chickens]. *Science Rise*, 4(1), 94-97. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.15587/2313-8416.2014.29279>
- [6] Bushuieva, I. V., Kirichko, B. P., Knyshe, E. G., Panasenko, O. I., & Izdepskiy V. I. (2014). Vyvchennia vplyvu morfolinii 2-[5-(pirydyn-4-il)-1,2,4-triazol-3-iltio]atsetatu na profilaktyku stresovykh staniv [The study of morpholinium 2-[5-(pyridin-4-yl)-1,2,4-triazol-3-ylthio]acetate effect on prevention of stressful conditions]. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*, (2), 64-66. [in Ukrainian].
- [7] Martynyshyn V. P., Hunchak, V. M., Panasenko, O. I., Parchenko, V. V., & Shcherbina R. O. (2019). *Sposib likuvannia dermatologichnykh zakhvoriuvan* [Method of treatment of dermatological diseases]. Ukraine Patent UA 138684. <https://sis.ukrpatent.org/uk/search/detail/1396036/>
- [8] Bushuieva I. V., Knyshe Ye. H., & Panasenko O. I. (2014). Doslidzhennia likuvalnoi efektyvnosti morfolinii 2-[5pirydyn-4-il)-1,2,4-tryazol-3-iltio]atsetatu pry khvorobakh deiakykh vydiv tvaryn [Therapeutic effectiveness investigation of morpholine 2 [5-(pyridin-4-yl) -1,2,4-triazole-3-yl-thio] acetate at diseases of some animal species]. *ScienceRise*, 3(1), 100-104. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.15587/2313-8416.2014.27998>
- [9] Kotsiumbas, I. Ya., Malyk, O. H., Patereha, I. P., Tishyn, O. L., & Kosenko, Yu. M. (2006). *Doklinichni doslidzhennya veterynarnykh likarskykh zasobiv* [Preclinical studies of veterinary medicinal products]. Triada plus. [in Ukrainian].



# Microscopic, submicroscopic characterization of pro- and anti-inflammatory cell phenotypes of the lungs in conditions of experimental allergic inflammation

S. S. Popko \*

Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine

**The aim** is to study the microscopic and submicroscopic characteristics of pro- and anti-inflammatory cell phenotypes of the lungs under conditions of experimental allergic inflammation.

**Material and methods.** We used histological and electron microscopic methods to study the lungs of 48 male guinea pigs in experimental ovalbumin-induced allergic inflammation, simulated by subcutaneous sensitization and subsequent intranasal inhalation with ovalbumin. Submicroscopic changes of respiratory endocrine cells, goblet cells, exocrine bronchiolar cells, mast cells, macrophages, eosinophils, endothelial cells of guinea pigs lungs were determined.

**Results.** The most significant reactive submicroscopic changes were established on the 23<sup>rd</sup> and 30<sup>th</sup> days of observation in the form of an increase in the functional activity of exocrine bronchiolar and goblet cells, as evidenced by the presence of a light nucleus with a predominance of euchromatin, nucleoplasm of low electron-optical density, nucleoli, developed granular endoplasmic reticulum and an increase in the number of goblet cells secretory mucous granules by electron microscopic examination. The revealed ultramicroscopic features of respiratory endocrine cells (an increase in a number of "empty" core dense vesicles), eosinophilic granulocytes (piecemeal degranulation), an increase in the number of mast cells granules, numerous pseudopodia in macrophages are the confirmation of the active participation of these cell phenotypes in the initiation of inflammation during the early period of the allergic inflammatory process in lungs.

**Conclusions.** A significant reaction of the innate nonspecific and adaptive immunity occurs in airways during the experimental ovalbumin-induced allergic inflammation, consisting primarily of the functional activation of eosinophilic granulocytes, mast cells, and macrophages, as well as an increase in the secretory activity of exocrine bronchiolar cells and goblet cells, which is confirmed by the changes investigated by electron microscopic examination and are accompanied by reactive changes in the vessels of microcirculatory bed.

**Key words:** electron microscopy, exocrine bronchiolar cell, mast cell, respiratory endocrine cell, goblet cells, guinea pigs.

**Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 288–294**

## Мікроскопічна, субмікроскопічна характеристика про- та антизапальних клітинних фенотипів легень в умовах експериментального алергічного запалення

С. С. Попко

**Мета роботи** – з'ясувати мікроскопічну, субмікроскопічну характеристику про- та антизапальних клітинних фенотипів легень в умовах експериментального алергічного запалення.

**Матеріали та методи.** Застосувавши експериментальний, гістологічний та електронномікроскопічний методи, вивчили легені 48 самців морської свинки в умовах гострого овальбумін-індукованого алергічного запалення, яке моделювали шляхом підшкірної сенсibiлізації та наступної інтраназальної інгаляції овальбуміном. Визначали субмікроскопічні зміни дихальних ендокриноцитів, келихоподібних і бронхіолярних екзокриноцитів, макрофагів, мастоцитів, еозинофілів та ендотеліоцитів судин гемомікроциркуляторного русла легень морських свинок.

**Результати.** Найістотніші реактивні субмікроскопічні зміни виявили на 23 і 30 доби спостереження, а саме підвищення функціональної активності бронхіолярних і келихоподібних екзокриноцитів у складі епітелію дихальних шляхів. Про це свідчили наявність світлого ядра з переважанням еухроматину, нуклеоплазми низької електроннооптичної щільності, ядерця, розвинута гранулярна ендоплазматична сітка та збільшення кількості секреторних слизових гранул келихоподібних екзокриноцитів під час електронномікроскопічного дослідження. Визначили ультрамікроскопічні особливості дихальних ендокриноцитів: збільшення кількості «порожніх» везикул зі щільною серцевиною, еозинофільних гранулоцитів – ознаки часткової дегрануляції; збільшення кількості гранул високої електроннооптичної щільності в цитоплазмі мастоцитів; численні псевдоподії макрофагів є підтвердженням активної участі цих клітинних фенотипів в ініціації запалення протягом раннього періоду розвитку алергічного запального процесу в легенях.

**Висновки.** В експериментальній моделі овальбумін-індукованого алергічного запалення дихальних шляхів виникає суттєва реакція з боку клітинної ланки вродженого неспецифічного й адаптивного імунітету, що полягає передусім у функціональній активації еози-

### ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/264993>

UDC 611.24.018.2:616-002-021.5-092.9].086

DOI: [10.14739/2409-2932.2022.3.264993](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2022.3.264993)

**Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 288–294**

**Key words:** electron microscopy, exocrine bronchiolar cell, mast cell, respiratory endocrine cell, goblet cells, guinea pigs.

\*E-mail: [kluchkovs@gmail.com](mailto:kluchkovs@gmail.com)

Received: 11.08.2022 // Revised: 26.08.2022 // Accepted: 06.09.2022

нофільних гранулоцитів, мастоцитів і макрофагоцитів, а також збільшенні секреторної активності бронхіолярних і келихоподібних екзокриноцитів; це підтверджується змінами, що спостерігали під час електронномікроскопічного дослідження та супроводжувалися реактивними змінами судин мікроциркуляторного русла.

**Ключові слова:** електронна мікроскопія, бронхіолярний екзокриноцит, мастоцит, дихальний ендокриноцит, келихоподібний екзокриноцит, морська свинка.

**Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2022. Т. 15, № 3(40). С. 288–294**

Nowadays three main processes responsible for the clinical manifestations of bronchial asthma are well known: airway allergic inflammation, bronchoconstriction, and mucus hyperproduction. However, the underlying histopathophysiological mechanisms responsible for these processes are complex and multifaceted, including diverse cellular phenotypes and cytokines [1–3]. In addition, the activity and influence of each cellular and molecular component varies considerably between individuals and may change with time, response to drug therapy, and environmental exposure, so it is extremely important to study the histophysiology of the allergic inflammatory process in a chronobiological aspect.

Among various cell phenotypes, some key cells that are usually involved in the initiation of the main histophysiological processes in the lungs can be identified, namely respiratory endocrine cells, eosinophils, mast cells as pro-inflammatory cell phenotypes [4–6]. Mast cells are involved in both innate and adaptive immune responses to allergens. Thanks to the presence of heparin, secreted by perivascular mast cells into the intercellular substance of the connective tissue, the permeability of microvessels increases, which in case of allergic inflammation causes the release of lymphocytes and plasma cells into the perivascular intercellular substance [6]. In addition, according to scientists, mast cells contribute to the maintenance of the chronic allergic inflammatory process of the respiratory tract and play a central role in the initiation of the immune response to the allergen, during which they transmit signals that stimulate the synthesis of IgE by plasma cells and the differentiation of Th2 lymphocytes [7].

Exocrine bronchiolar cells (EBCs) are antagonists of pro-inflammatory cellular phenotypes with an immunomodulatory effect in the form of suppression of the allergic inflammatory process. EBCs perform specialized functions necessary to protect the body in a normal state, but retain the ability to proliferate in response to damage. Some EBCs provide renewal of the epithelial line after damage to ciliated cells and other cell phenotypes [8]. EBCs also exert an anti-inflammatory immunomodulatory effect: their secretory protein CC16 regulates the immune response to various infectious agents and allergens in the lungs [8].

Detailing the ultrastructure of these cellular phenotypes of airways and lungs during the experimental allergic inflammatory process in the chronobiological aspect is necessary for a better understanding of the histophysiology of allergic inflammation, but to date it is not described enough.

## Aim

The aim of this research is to study the microscopic and submicroscopic characteristics of pro- and anti-inflammatory

cell phenotypes of the lungs under conditions of experimental allergic inflammation.

## Materials and methods

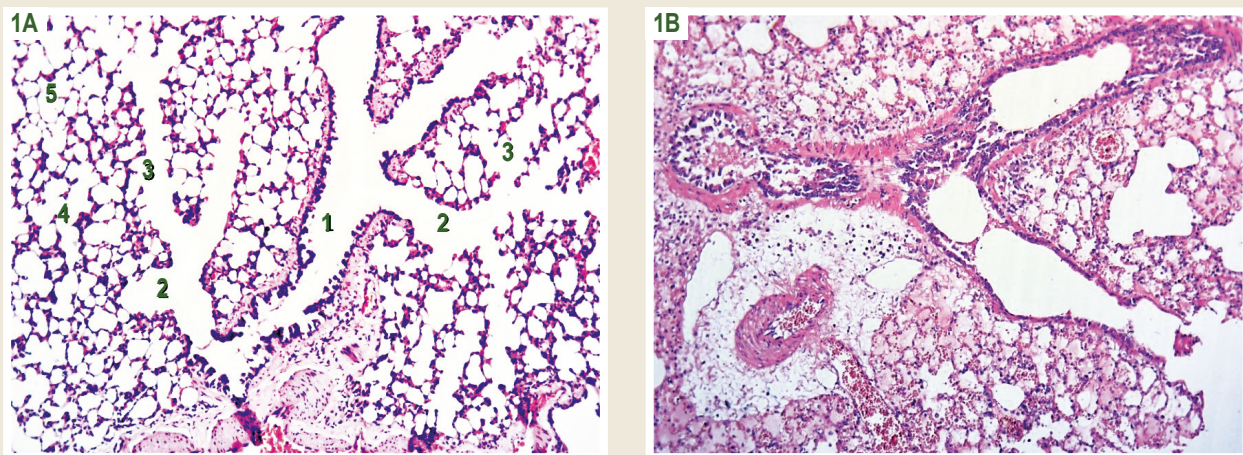
The experiment was performed on 48 male guinea pigs, which were involved under standard macroenvironmental conditions in the animal facility of Zaporizhzhia State Medical University. All experimental procedures and animal care were carried out according to ethical guidelines (Strasbourg, 1986; Kyiv, 2001).

**Experimental model of allergic airway disease.** Induction of airway allergic inflammatory process was performed by subcutaneous sensitization and airway challenge through nasal inhalation with OVA (0.5 mg/mL per animal) mixed with aluminum hydroxide (10 mg/mL in saline per animal) on days 0, 7 and 14. From 21 to 28 days animals were exposed for 15 min to an aerosol of OVA (10 mg/mL in saline) using a nebulizer (Little Doctor International, Singapore, LD-211C) attached to a plastic chamber [9].

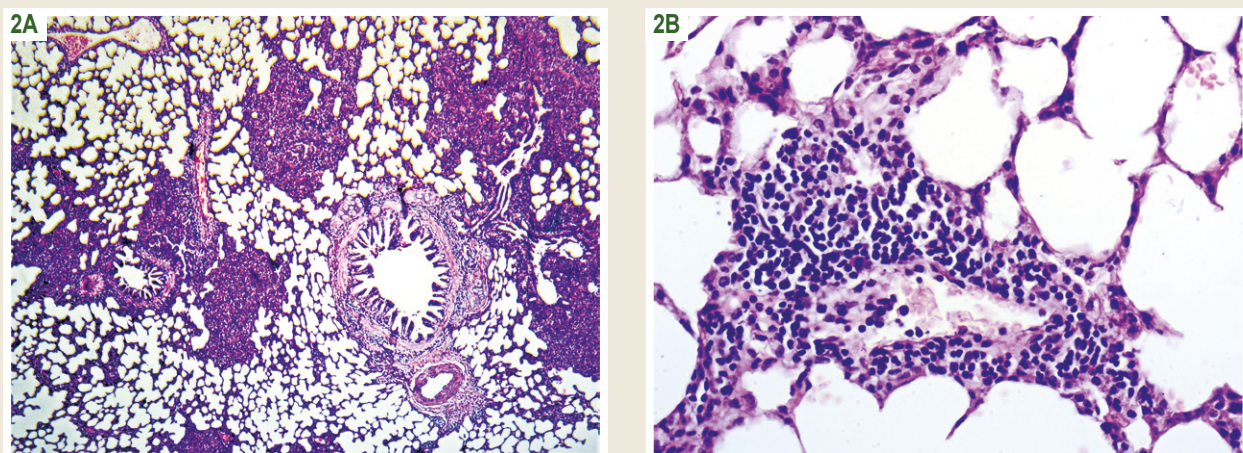
**Experimental design.** Animals were assigned equally into six experimental groups of 8 guinea pigs each. Group I–IV were guinea pigs sensitized and challenged with ovalbumin (OVA) (Sigma Aldrich, USA) with alum as an adjuvant (AlumVax Hydroxide vaccine adjuvant, OZ Biosciences, France), dropped out of the experiment respectively on the 23<sup>rd</sup>, 30<sup>th</sup>, 36<sup>th</sup> and 44<sup>th</sup> days after its start. Group V – guinea pigs sensitized and exposed to saline, served as control. Group VI – intact animals (norm).

Lungs removed and fixed in 10 % neutral buffered formalin. Formalin-fixed, paraffin wax embedded lung specimens were selected for histological preparation, prepared as 4 μm thick sections and stained with hematoxylin, and eosin for routine examination. Histological study was carried out on Carl Zeiss Primo Star microscope equipped with the Axiocam digital microphoto attachment using the ZEISS ZEN 2011 software.

Electron microscopy was performed on glutaraldehyde-fixed 1 × 1 mm specimens of lung tissue followed by processing in a 1 % solution of osmium tetroxide. Subsequently, the pieces were dehydrated in a series of graded ethanol up to 100 % according to histological standards, acetone with additional contrasting for 2 hours in 2.5 % uranyl acetate at 700 C. Pouring into the block was carried out by gradual impregnation of the material with acetone oxide with Eponym (2:1, 1:1, 1:2) and poured into pure Epon. The resin polymerization was carried out in two stages at 36 °C (12 hours) and 56 °C (24 hours). Ultra-thin (55–65 nm) sections were obtained on a “Power-Tome RMC Boeckeler” ultratom and contrasted with Reynolds lead citrate for 25 minutes at room temperature [10]. Ultrathin sections were viewed on a PEM-100-01 electron microscope.



**Fig. 1.** Internal architecture of a guinea pig lung in the norm (A) and in the early stage of the allergic inflammatory process (B). **A.** Intact group. 1: terminal bronchiole; 2: respiratory bronchiole; 3: alveolar duct; 4: alveolar sac; 5: alveoli. **B.** Experimental group I (23<sup>rd</sup> day after the start of the experiment). Stain: hematoxylin and eosin,  $\times 100$ .



**Fig. 2.** Histological changes in the guinea pigs lungs in the late stage of the allergic inflammatory process. Experimental group IV (44<sup>th</sup> day after the start of the experiment). Stain: hematoxylin and eosin. **A:**  $\times 100$ ; **B:**  $\times 400$ .

The ultrastructure of dense core vesicles (DCV) of respiratory endocrine cells was identified. We studied the ultrastructural features of goblet cells and EBCs, macrophages, mast cells, eosinophils, and endothelial cells of blood vessels of the pulmonary hemomicrocirculatory bed during the early and late stages of the experimental allergic inflammatory process.

## Results

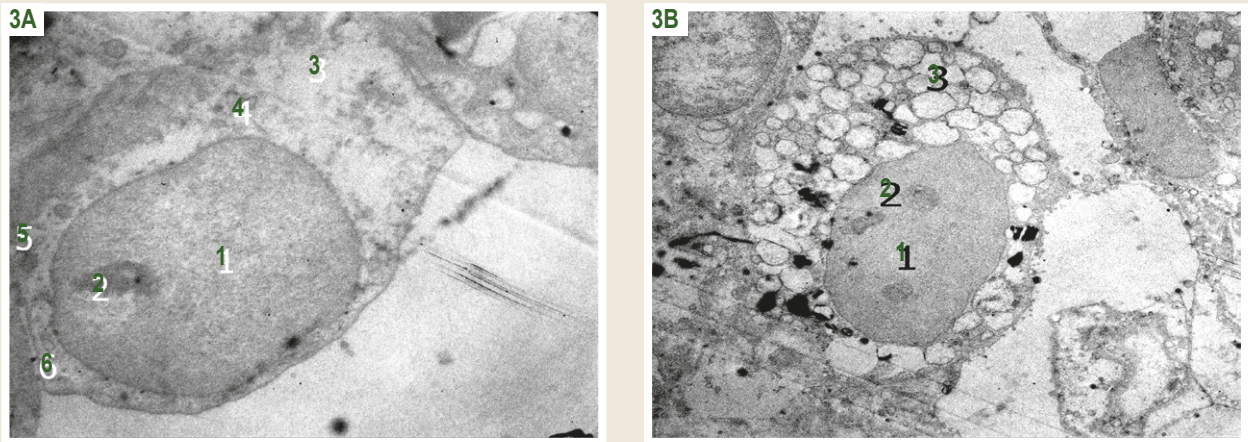
The structural basis of the internal structure of the guinea pigs' lungs consists of pyramidal or cone-shaped lung lobes. Dichotomous branching of small bronchi and bronchioles continues into the pulmonary lobe. The lobes are separated from each other by thin layers of connective tissue, poorly developed in guinea pigs. Inside the lung lobes, the inner diameter of the small bronchi decreases and as a result of their branching, they become terminal bronchioles – the final part of airways (Fig. 1a).

Terminal bronchioles branch, in turn, into respiratory bronchioles, the last generations of which already pass into cellular ducts, which receive 2–3 alveolar sacs, which blindly

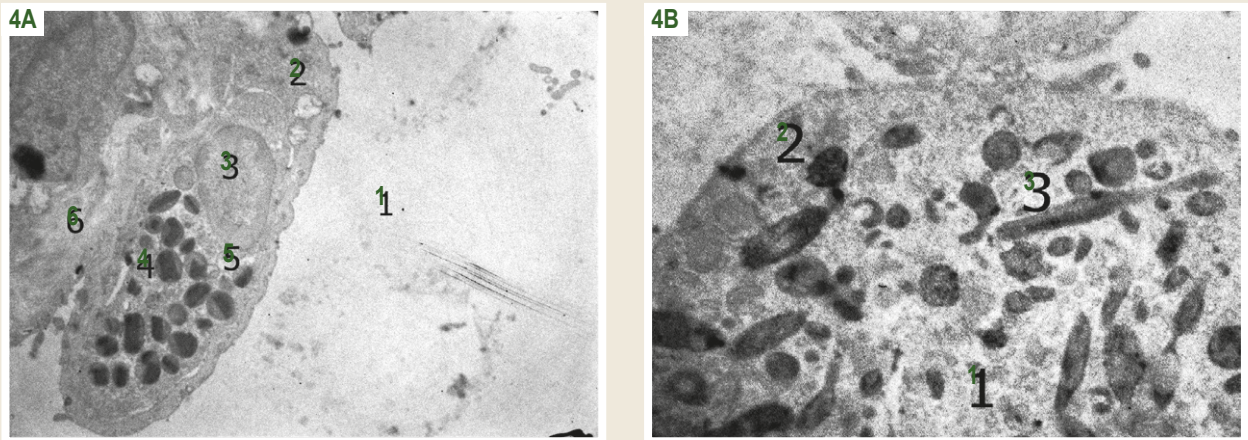
end into alveoli. Each lung lobe consists of 12–13 pulmonary acini. According to the internal architecture, guinea pig lungs can be attributed to the “light” or alveolar type of lungs – with a developed and large alveolar part, which provides a larger respiratory surface, and a poorly developed connective tissue stroma. However, the lungs of this type have a developed elastic framework. In OVA-sensitized guinea pigs during histological examination in the early period of the development of experimental allergic inflammation, we found thickening of the wall of small bronchi and terminal bronchioles, changes in the structure of pulmonary acini, and vessels of the hemomicrocirculatory bed, an increase in the number of immunocompetent cells, compared to the control group (Fig. 1b).

The detected changes are exudative-inflammatory in nature and coincide with the most pronounced clinical manifestations of allergic inflammation in guinea pigs (asphyxia, tachypnea, orthopnea). The degree of manifestation of inflammatory changes increases as the caliber of the bronchi decreases, reaching its maximum in the terminal bronchioles. During the late period of the development of

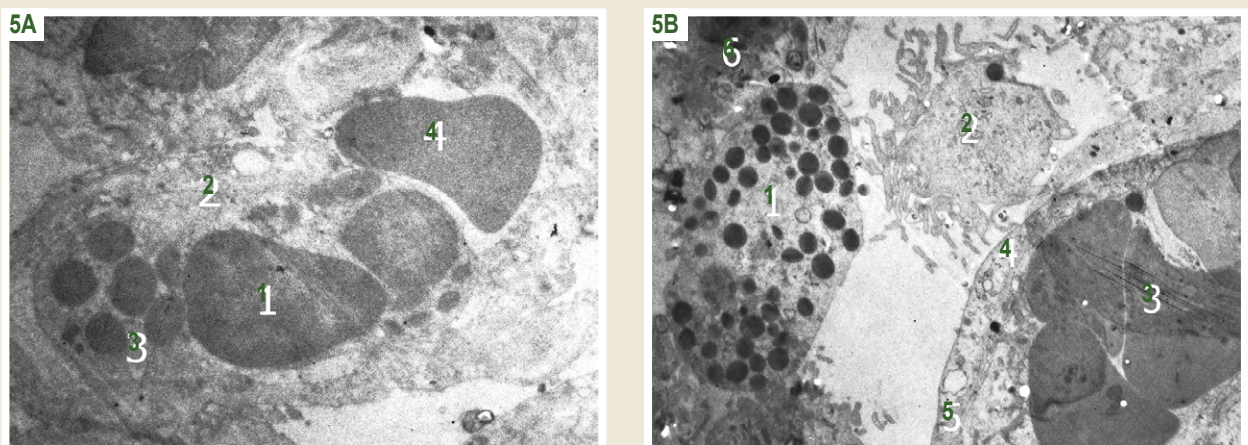




**Fig. 3.** Submicroscopic changes of epitheliocytes in airways under conditions of experimental allergic inflammation. **A.** Exocrine bronchiolar cell (experimental group I, 23<sup>rd</sup> day of the experiment). 1: nucleus; 2: nucleolus; 3: cytoplasm; 4: mitochondria; 5: lysosome; 6: granular endoplasmic reticulum. **B.** Goblet cell (experimental group II, 30<sup>th</sup> day of the experiment). 1: nucleus; 2: nucleolus; 3: an increase in the number of secretory mucous granules in the cytoplasm. Transmission electron microphotos,  $\times 6000$ .



**Fig. 4.** Ultrastructural features of eosinophilic granulocytes in guinea pigs lungs in the early stage of the allergic inflammatory process. **A.** Control group. 1: lumen of a blood vessel; 2: eosinophilic granulocyte; 3: nucleus; 4: large eosinophilic granule; 5: small eosinophilic granule; 6: endothelium of a blood vessel. **B.** Experimental group I (23<sup>rd</sup> day after the start of the experiment). 1: cytoplasm; 2: lysosome; 3: "eosinophilic sombrero-vesicle". Transmission electron microphotos. **A:**  $\times 6000$ ; **B:**  $\times 8000$ .



**Fig. 5.** Perivascular mast cell (**A**) and respiratory endocrine cell of the "open" type (**B**) in the lungs of a guinea pig. **A.** Experimental group III (36<sup>th</sup> day of the experiment). 1: nucleus; 2: cytoplasm; 3: basophilic granules; 4: erythrocyte in the lumen of a blood capillary. **B.** Experimental group I (23<sup>rd</sup> day of the experiment). 1: respiratory endocrine cell; 2: activated macrophage; 3: erythrocytes in the lumen of the postcapillary venule; 4: endothelial cell of the postcapillary venule; 5: a pinocytotic vesicle in the cytoplasm of the endothelial cell; 6: bronchiolar epithelium. Transmission electron microphotos. **A:**  $\times 2200$ ; **B:**  $\times 3000$ .

the allergic inflammatory process in the guinea pig lungs, proliferative changes appear in the form of an increase in the development of broncho-associated lymphoid tissue against the background of the expansion of alveoli and the thinning of interalveolar septa that occur with emphysematous changes (Fig. 2b). Areas of emphysema alternate with areas of atelectasis (Fig. 2a).

EBCs are localized mainly in terminal and respiratory bronchioles and are the main cellular phenotype of the distal airways of the guinea pig. The cells are pyramidal in shape with the apical part protruding into the lumen of the terminal bronchiole. The light oval-shaped nucleus is large, has a medium electron-optical density, with a predominance of euchromatin, contains a nucleolus. Mitochondria, granular endoplasmic reticulum, and lysosomes with signs of degeneration are present in the cytoplasm. There are dense intercellular contacts with neighboring cells. In the conditions of the allergic inflammatory process, we observed signs of increased functional activity of EBCs: the presence of a light nucleus with a predominance of euchromatin, nucleoplasm of low electron-optical density, nucleoli, and a developed granular endoplasmic reticulum (Fig. 3a). We observed the most significant submicroscopic changes in goblet cells in airways against the background of sensitization and aeroallergization with ovalbumin in the early stage of allergic inflammation. At the submicroscopic level, we found an increased number of granules with mucous secretion in the cytoplasm of goblet cells (Fig. 3b).

At the ultrastructural level, in the cytoplasm of eosinophilic granulocytes, there are specific (secondary) large eosinophilic granules of an oval shape of different electron-optical density. Specific granules contain a centrally located crystalloid body of high electron-optical density and a peripheral matrix of low electron-optical density surrounded by a membrane. Nonspecific (primary) small eosinophilic granules are smaller in size and contain Charcot-Leyden crystalloid protein. It is interesting that the circulating eosinophilic granulocyte, before penetrating the lung tissue, “sticks” to the endothelium of a blood vessel and “rolls” on its surface (Fig. 4a). During the early stage of the allergic inflammatory process, we observed submicroscopic signs of piecemeal degranulation (PMD) in eosinophilic granulocytes. Vesicles (both round and tubular) are released from specific granules and move to the cell membrane for exocytosis of their contents. Tubular vesicles twist into an elongated ring-like structure described by the term “eosinophilic sombrero-vesicles” (Fig. 4b).

During the ultramicroscopic examination, we found the presence of perivascular mast cells and mast cells of the mucous membrane of granules in the cytoplasm, which are larger in size than eosinophilic granules, but less numerous. After sensitization with ovalbumin, the number of secretory granules in the cytoplasm of mast cells increased (Fig. 5a). On electron microscopic examination, the identification of small cytoplasmic, usually spherical secretory granules, otherwise known as dense core vesicles (DCV), is the main ultrastructural characteristic of respiratory endo-

crine cells. According to the results of our research, the size and appearance of the granules vary from 70 nm to 200 nm. Granules contain a core of variable electron-optical density in the center, usually separated from the surrounding thin, electron-transparent zone by a three-layer membrane. Granules are observed throughout the cytoplasm, but, in our opinion, are more often concentrated in the perinuclear and basal parts of the cytoplasm of the respiratory endocrinocyte (Fig. 5b). Depending on the ultramicroscopic features, vesicles with a dense core of respiratory endocrine cells of guinea pigs can be divided into two types. DCV type 1 has a wedge-shaped or oval shape with a dense amorphous core and a diameter of approximately 130 nm. There is usually no halo between the dense core and the membrane. In contrast, type 2 DCV are approximately 100 nm in diameter, more circular in shape, and have a smaller core that is surrounded by a distinct 15 to 20 nm halo. “Empty” vesicles of respiratory endocrine cells were more often observed in experimental groups I and II in the early period of the development of allergic inflammation in direct contact with the extracellular space. Differences in the morphology of DCV in individual cells are interpreted depending on the stage of their formation or secretion. Other characteristics of respiratory endocrine cells that we found at the ultrastructural level include a different number of free ribosomes and mitochondria, the latter usually smaller in size than in neighboring cells. The Golgi apparatus is well visualized and is located in the supranuclear zone. Granular and agranular endoplasmic reticulum and inclusion of glycogen in a small amount.

During the development of the experimental allergic inflammatory process in the lungs of the guinea pig, we also established submicroscopic changes, which were manifested by the decompensation of the processes of barrier function and selective permeability of the wall of blood capillaries and extracapillary venules. We determined the swelling of endotheliocytes, which led to the formation of protrusions, folds, and as a result of which the shape of the vascular lumen changed, the blood formed blood elements in the lumen of the capillary venules. Therefore, of these morphological changes at the submicroscopic level, we found that in the regions of protrusions and folds of the cytoplasm of endotheliocytes, the fusion of pinocytotic vesicles and the formation of vacuoles with their subsequent separation into the lumen of vessels took place. Macrophages had submicroscopic signs of increased functional activity: the presence of numerous pseudopodia, lysosomes, and autophagosomes in the cytoplasm (Fig. 5b).

## Discussion

The most significant morphological changes at the light-optical level of the intrapulmonary bronchi and lungs of experimental animals were observed in the distal parts of the intrapulmonary airways and in the alveoli in the early stage of the inflammatory process (23<sup>rd</sup> and 30<sup>th</sup> days after the start of the experiment). The late (36<sup>th</sup> and 44<sup>th</sup> days after the start of the experiment) period of the allergic inflammatory process in the lungs is accompanied by a gradual decrease

in the activity of eosinophilic inflammation. Attention was drawn to the decrease in the diameter of the lumen of small bronchi and terminal bronchioles, probably due to hyperplasia and hyperreactivity of the smooth muscle component. Similar changes were observed by other scientists [11].

Our work demonstrates submicroscopic signs of an increase in the functional activity of mast cells of the mucous membrane of the respiratory tract during the early period of the development of experimental allergic inflammation, as evidenced by the presence of large granules of high electron-optical density in their cytoplasm. A similar trend is present in the works of other scientists [6,7]. In conditions of OVA-sensitization, the submicroscopic changes of the perivascular mast cells are more significant, which, in our opinion, determines the histochemical changes of the surrounding microvessels of the connective tissue and the morphometric changes of the vessels of the pulmonary hemomicrocirculatory bed in the animals of the experimental groups that we discovered earlier [12,13]. After all, together with respiratory endocrine cells, mast cells contribute to the maintenance of local homeostasis of the lungs in normal conditions and after the action of environmental factors, which is consistent with the opinion of other scientists [7,14,15].

The most significant reactive submicroscopic changes were established on the 23<sup>rd</sup> and 30<sup>th</sup> days of observation in the form of an increase in the functional activity of exocrine bronchiolar and goblet cells in airway epithelial lining. In our opinion, this is related to the activation of nonspecific resistance of airways epithelial lining in response to OVA-sensitization. Hypertrophy and increase in a number of secretory granules in goblet cells is a morphological confirmation of the development of bronchial hyperreactivity as a result of the action of an allergen, which is primarily associated with the action of CGRP (calcitonin gene-related peptide) of respiratory endocrine cells – pro-inflammatory cells, as well as innate lymphoid cells of type 2, confirmed by the results studies by other authors [16].

Under the influence of their cytokines, eosinophils are activated, first of all, their number increases in the bronchiolar epithelium and connective tissue of the lungs. The latter, in turn, increases mucus secretion by goblet cells and stimulates hypertrophy and contraction of the smooth muscle component of the bronchi. IL-13 of type 2 innate lymphoid cells directly affects the goblet cells of the mucous membrane of the respiratory tract, stimulating their hyperplasia and increased secretion of mucus. Cytokine IL-5 activates eosinophils, increases their number and their secretion of leukotriene C4 cytokines and platelet-activating factors. The latter increases mucin secretion by goblet cells and stimulates contraction of the smooth muscle component of bronchi and blood vessels [17]. IL-13 stimulates goblet cell hyperplasia and mucus secretion. The results of our morphometric and electron microscopic research on hyperplasia and increased secretory activity of goblet cells with an increase in the number and secretory activity of respiratory endocrine cells are confirmed by the data of other scientific studies [4,14,18].

## Conclusions

1. A significant reaction of the innate nonspecific and adaptive immunity occurs in airways during the experimental ovalbumin-induced allergic inflammation, consisting primarily of the functional activation of eosinophilic granulocytes, mast cells, and macrophages, as well as an increase in the secretory activity of exocrine bronchiolar cells and goblet cells, which is confirmed by the changes investigated by electron microscopic examination.

2. Ultrastructural changes of mast cells are accompanied by reactive changes in the vessels of microcirculatory bed, manifested by decompensation of barrier function processes and selective permeability of the wall of blood capillaries and postcapillary venules.

**Prospects for further research.** We are planning an electron microscopic study of the components of the lymphoid tissue associated with the bronchi of guinea pigs in the conditions of the early and late periods of the experimental allergic inflammatory process.

## Funding

This research is a part of the research work of Zaporizhzhia State Medical University “Immunomorphological characteristics of internal organs under the influence of endo and exogenous factors on the body”, state registration No. 0118U004250.

**Conflicts of interest:** author has no conflict of interest.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

## Information about author:

Popko S. S., PhD, Associate Professor of the Department of Histology, Cytology and Embryology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine. ORCID ID: [0000-0002-5533-4556](https://orcid.org/0000-0002-5533-4556)

## Відомості про автора:

Попко С. С., канд. мед. наук, доцент каф. гістології, цитології та ембріології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

## References

- [1] Carlini, F., Picard, C., Garulli, C., Piquemal, D., Roubertoux, P., Chiaroni, J., Chanez, P., Gras, D., & Di Cristofaro, J. (2017). Bronchial Epithelial Cells from Asthmatic Patients Display Less Functional HLA-G Isoform Expression. *Frontiers in Immunology*, 8, 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00006>
- [2] Kiboneka, A., & Kibuule, D. (2019). The Immunology of Asthma and Allergic Rhinitis. In *Rhinosinusitis*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86964>
- [3] Wang, W., Li, Y., Lv, Z., Chen, Y., Li, Y., Huang, K., Corrigan, C. J., & Ying, S. (2018). Bronchial Allergen Challenge of Patients with Atopic Asthma Triggers an Alarmin (IL-33, TSLP, and IL-25) Response in the Airways Epithelium and Submucosa. *Journal of Immunology*, 201(8), 2221-2231. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800709>
- [4] Barrios, J., Patel, K. R., Aven, L., Achey, R., Minns, M. S., Lee, Y., Trinkaus-Randall, V. E., & Ai, X. (2017). Early life allergen-induced mucus overproduction requires augmented neural stimulation of pulmonary neuroendocrine cell secretion. *FASEB Journal*, 31(9), 4117-4128. <https://doi.org/10.1096/fj.201700115R>
- [5] McBrien, C. N., & Menzies-Gow, A. (2017). The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma. *Frontiers in Medicine*, 4, 93. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00093>
- [6] Elieh Ali Komi, D., & Bjermer, L. (2019). Mast Cell-Mediated Orchestration of the Immune Responses in Human Allergic Asthma: Current Insights. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 56, 234-247. <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8720-1>

- [7] Méndez-Enríquez, E., & Hallgren, J. (2019). Mast Cells and Their Progenitors in Allergic Asthma. *Frontiers in immunology*, 10, 821. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00821>
- [8] Rokicki, W., Rokicki, M., Wojtacha, J., & Dzeljijli, A. (2016). The role and importance of club cells (Clara cells) in the pathogenesis of some respiratory diseases. *Kardiochirurgia i torakochirurgia polska = Polish journal of cardio-thoracic surgery*, 13(1), 26-30. <https://doi.org/10.5114/kitp.2016.58961>
- [9] Cai, Z., Liu, J., Bian, H., & Cai, J. (2019). Albigflorin alleviates ovalbumin (OVA)-induced pulmonary inflammation in asthmatic mice. *American journal of translational research*, 11(12), 7300-7309.
- [10] Dey, P. (2018). Basic and advanced laboratory techniques in histopathology and cytology. *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology* (pp. 1-275). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/9789811082528>
- [11] Banno, A., Reddy, A. T., Lakshmi, S. P., & Reddy, R. C. (2020). Bidirectional interaction of airway epithelial remodeling and inflammation in asthma. *Clinical science*, 134(9), 1063-1079. <https://doi.org/10.1042/CS20191309>
- [12] Popko, S. S. (2021). Morphological rearrangement of the metabolic link of the microcirculatory bed of guinea pigs lungs after sensitization with ovalbumin. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*, 14(1), 79-83. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2021.1.226851>
- [13] Popko, S., Yevtushenko, V., Kaplaushenko, A., & Tertishnyi, S. (2022). The resistive region of pulmonary microvessels in ovalbumin-sensitized guinea pigs: a quantitative and qualitative histological study. *Biologija*, 68(1), 43-51. <https://doi.org/10.6001/biologija.v68i1.4703>
- [14] Barrios, J., Kho, A. T., Aven, L., Mitchel, J. A., Park, J. A., Randell, S. H., Miller, L. A., Tantisira, K. G., & Ai, X. (2019). Pulmonary Neuroendocrine Cells Secrete  $\gamma$ -Aminobutyric Acid to Induce Goblet Cell Hyperplasia in Primate Models. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 60(6), 687-694. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2018-0179OC>
- [15] Garg, A., Sui, P., Verheyden, J. M., Young, L. R., & Sun, X. (2019). Consider the lung as a sensory organ: A tip from pulmonary neuroendocrine cells. *Current topics in developmental biology*, 132, 67-89. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.12.002>
- [16] Sui, P., Wiesner, D. L., Xu, J., Zhang, Y., Lee, J., Van Dyken, S., Lashua, A., Yu, C., Klein, B. S., Locksley, R. M., Deutsch, G., & Sun, X. (2018). Pulmonary neuroendocrine cells amplify allergic asthma responses. *Science*, 360(6393), eaan8546. <https://doi.org/10.1126/science.aan8546>
- [17] Katoh S. (2022). Critical Involvement of CD44 in T Helper Type 2 Cell-Mediated Eosinophilic Airway Inflammation in a Mouse Model of Acute Asthma. *Frontiers in immunology*, 12, 811600. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.811600>
- [18] Popko, S. S., Yevtushenko, V. M., & Zidrashko, H. A. (2022). Characteristics of CD56-positive cells in guinea pig lung in the dynamics of experimental allergic inflammation. *Zaporozhye Medical Journal*, 24(1), 79-83. <https://doi.org/10.14739/2310-1210.2022.1.235880>



# Особливості планіметричної організації ендокринної частини підшлункової залози у гіпертензивних щурів лінії SHR

Т. В. Іваненко \*

Запорізький державний медичний 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

Аналіз ендокринної структури підшлункової залози й оцінювання ступеня її гетерогенності є ключовими для визначення таких важливих фізіологічних параметрів, як маса острівцевих ендокриноцитів у здорових людей або функціональний резерв β-клітин у пацієнтів із діабетом 1 і 2 типів.

**Мета роботи** – здійснити порівняльний планіметричний аналіз панкреатичних острівців нормотензивних щурів лінії Wistar і гіпертензивних щурів лінії SHR, використовуючи метод подвійного імунофлуоресцентного забарвлення ендокриноцитів.

**Матеріали та методи.** Дослідження здійснили на підшлунковій залозі щурів лінії SHR і Wistar. Інсулін і глюкагон в острівцях підшлункової залози визначали імунофлуоресцентним методом. Реакцію імунофлуоресценції оцінювали за допомогою флуоресцентного мікроскопа Axiolmager-M2.

**Результати.** Планіметричний аналіз виявив панкреатичні острівці всіх типів у тканині підшлункової залози щурів ліній SHR і Wistar. У гіпертензивних тварин лінії SHR кількість одиничних ендокриноцитів в 2,3 раза більша ( $p < 0,001$ ), а гігантських острівців – на 34,2 % більша ( $p < 0,001$ ), ніж у нормотензивних щурів лінії Wistar. В окремих ендокриноцитах виявили ділянки, що характеризуються імунореактивністю відразу до двох гормонів – інсуліну та глюкагону. Такі ділянки виявили в острівцях усіх типів обох ліній щурів, але сумарні показники у гіпертензивних щурів лінії SHR на 21,8 % нижчі ( $p < 0,001$ ), ніж у нормотензивних щурів лінії Wistar.

**Висновки.** Планіметричний аналіз показав, що панкреатичні острівці в нормотензивних щурів лінії Wistar і гіпертензивних щурів лінії SHR становлять 1,4 % від площі перетину підшлункової залози. У гіпертензивних щурів лінії SHR у залозі визначили на 16,9 % більшу сумарну площу матеріалу, імунореактивного до інсуліну. На відміну від щурів лінії Wistar у підшлунковій залозі гіпертензивних щурів лінії SHR суттєво збільшена кількість поодиноких α-ендокриноцитів.

**Ключові слова:** щури лінії SHR, щури лінії Wistar, підшлункова залоза, панкреатичні острівці, ендокриноцит, імунофлуоресценція, інсулін, глюкагон.

**Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2022. Т. 15, № 3(40). С. 295–300**

## Features of the planimetric organization of the endocrine part of the pancreas in hypertensive rats of the SHR line

T. V. Ivanenko

Analysis of the endocrine structure of the pancreas and assessment of its degree of heterogeneity is key to assessing such important physiological parameters as islet endocrinocyte mass in healthy people or functional reserve of β-cells in patients with type 1 and type 2 diabetes.

**The aim** of the study is to perform a comparative planimetric analysis of pancreatic islets of normotensive Wistar rats and hypertensive SHR rats, using the method of double immunofluorescent staining of endocrinocytes.

**Materials and methods.** The study was performed on the pancreas of SHR and Wistar rats. Insulin and glucagon in the islets of the pancreas were determined by immunofluorescence. The immunofluorescence reaction was studied with an Axiolmager-M2 fluorescent microscope.

**Results.** Planimetric analysis showed the presence of pancreatic islets of all types in the pancreatic tissue of SHR and Wistar rats. The number of single endocrinocytes in SHR hypertensive animals was 2.3 times higher ( $P < 0.001$ ), and the number of giant islets was 34.2 % higher ( $P < 0.001$ ), than in normotensive Wistar rats. The presence of regions in some endocrinocytes, that show immunoreactivity to both hormones at once – insulin and glucagon. Such areas were present in islets of all types of both rat lines, however, the total rates in hypertensive rats of the SHR line were 21.8 % lower ( $P < 0.001$ ), than in normotensive rats of the Wistar line.

### ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/259868>

UDC 616.37-008.64-092.18-06:616.12-008.331]-092.9

DOI: [10.14739/2409-2932.2022.3.259868](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2022.3.259868)

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 295–300

**Key words:** rats inbred SHR, Wistar rat, pancreas, pancreatic islets, endocrinocyte, immunofluorescence, insulin, glucagon.

\*E-mail: [ivanenkotv@i.ua](mailto:ivanenkotv@i.ua)

Received: 31.05.2022 // Revised: 20.06.2022 // Accepted: 29.06.2022

**Conclusions.** Planimetric analysis showed, that the pancreatic islets in normotensive Wistar rats and hypertensive SHR rats occupy 1.4 % of the cross-sectional area of the pancreas. In hypertensive rats the SHR line in the gland by 16.9 % larger total area of the material immunoreactive to insulin. In contrast to Wistar rats, the number of single  $\alpha$ -endocrinocytes in the pancreas of hypertensive SHR rats was significantly increased.

**Key words:** rats inbred SHR, Wistar rat, pancreas, pancreatic islets, endocrinocyte, immunofluorescence, insulin, glucagon.

**Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 295–300**

Аналіз ендокринної структури підшлункової залози й оцінювання ступеня її гетерогенності є ключовими для визначення таких важливих фізіологічних параметрів, як маса острівцевих ендокриноцитів у здорових людей або функціональний резерв  $\beta$ -клітин у пацієнтів із діабетом 1 і 2 типів.

Методи імунофлуоресцентного та планіметричного аналізу застосовували для обрахунку маси  $\beta$ -ендокриноцитів в інтактній підшлунковій залозі [1], кількості та якості ізольованих острівців [2] і трансплантаційного матеріалу підшлункової залози [3], під час оцінювання функціонального резерву  $\beta$ -клітин у пацієнтів із цукровим діабетом 1 і 2 типів [4,5]. В експериментальній ендокринології метод імунофлуоресцентного та планіметричного аналізу дав змогу оцінити вплив пренатального стресу на постнатальний гістогенез панкреатичних острівців [6], вплив дозованих гіпоксичних навантажень на саногенез острівців [7], параметри ремоделювання острівцевого апарату при спонтанному формуванні артеріальної гіпертензії в щурів лінії SHR [8–10]. Разом із тим, головне завдання цих досліджень полягало у встановленні структурного й функціонального стану  $\beta$ -клітин як пулу ендокриноцитів підшлункової залози, що домінує та визначає фізіологічний стан гомеостазу глюкози в організмі. Менше уваги приділяли ролі  $\alpha$ -клітин і структурно-функціональному балансу організації панкреатичних острівців. Це пов'язано передусім зі складністю імунофлуоресцентного та планіметричного аналізу підшлункової залози, а також необхідністю використовувати метод подвійного імунофлуоресцентного забарвлення ендокриноцитів.

## Мета роботи

Здійснити порівняльний планіметричний аналіз панкреатичних острівців нормотензивних щурів лінії Wistar і гіпертензивних щурів лінії SHR, використовуючи метод подвійного імунофлуоресцентного забарвлення ендокриноцитів.

## Матеріали і методи дослідження

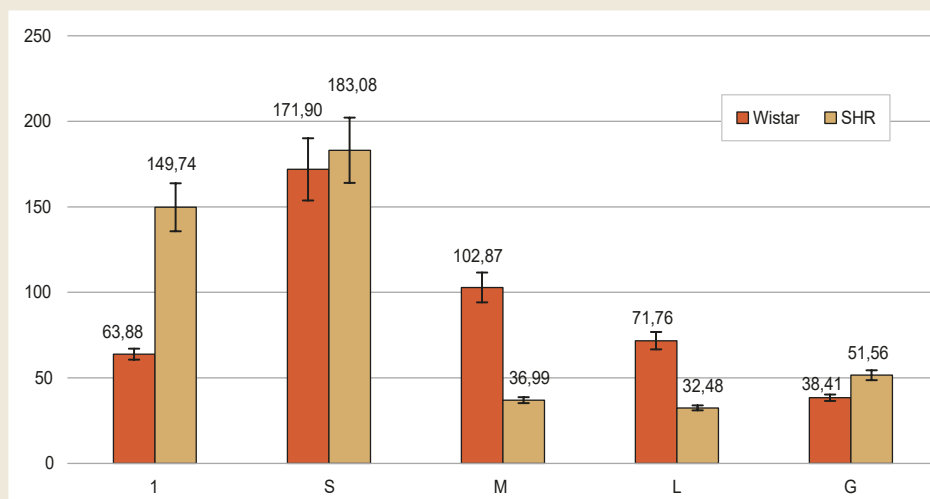
Дослідження здійснили на підшлунковій залозі щурів лінії SHR ( $n = 5$ ) і Wistar ( $n = 5$ ). Підшлункову залозу дорослого щура Wistar фіксували в розчині Буена (20 годин) і після стандартної гістологічної обробки заливали парапласт (McCormick, США). Серійні гістологічні зрізи підшлункової залози завтовшки 5 мкм, укладені на адгезивні предметні скельця, депарафінували та демаскували в цитратному буферному розчині PT Module citrate buffer ( $pH = 6,0$ ) у PT-модулі (Thermo Scientific, США). Інсулін

і глюкагон в острівцях підшлункової залози визначали імунофлуоресцентним методом, застосовуючи антитіла виробництва Santa Cruz Biotechnology (США). Антитіла до інсуліну (2D11-H5), кон'юговані з AlexaFluor®546, та антитіла до глюкагону (K79bB10), кон'юговані з FITC, інкубували у розведенні 1:200 (волога камера,  $T = +4$  °C, 24 години). Потім зрізи тричі промивали по 5 хв у фосфатному буферному розчині ( $pH = 7,4$ ), додавали середовище для збереження імунофлуоресценції UltraCruz™ Mounting Medium з додаванням DAPI (Santa Cruz Biotechnology, США).

Реакцію імунофлуоресценції вивчали за допомогою флуоресцентного мікроскопа AxioImager-M2 (Carl Zeiss, Німеччина), обладнаного високоемісійними фільтрами 43HE для детекції інсуліну та 38HE для виявлення глюкагону, а також 14-бітної цифрової монохромної CCD камери AxioCam-HRm (Carl Zeiss, Німеччина). Застосували метод подвійного імунофлуоресцентного забарвлення ендокриноцитів та їх послідовного аналізу в тому самому острівці. Це дало змогу отримати характеристику пулу  $\beta$ - та  $\alpha$ -ендокриноцитів у межах одного і того самого острівця. Для встановлення параметрів роботи цифрової CCD камери мікроскопа та зйомки флуоресценції використали систему аналізу цифрових зображень AxioVision-4.8.2 (Carl Zeiss, Німеччина), а для кількісного аналізу імунофлуоресцентного зображення застосували 64-бітну систему аналізу зображень ImageJ v.2.1.0/1.53c (відкритий вихідний код під ліцензією GNU General Public License).

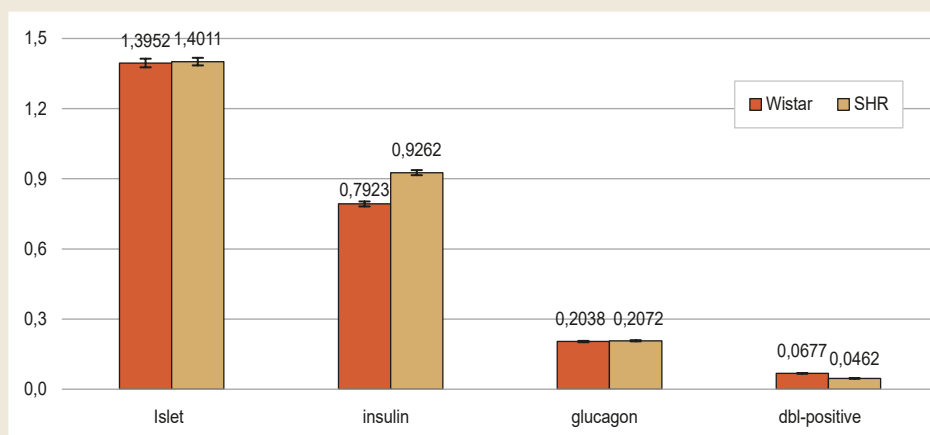
Планіметричний аналіз зрізів підшлункової залози передбачав вимірювання площі тканини залози, що досліджували; площі панкреатичних острівців; площі, що займає матеріал, імунореактивний до інсуліну, глюкагону; а також площі дубль-позитивного імунореактивного матеріалу, яка характеризувалася імунореактивністю до обох гормонів. Вимірювання здійснили сумарно на площі не менше ніж 200 мм<sup>2</sup> тканини підшлункової залози у тварин кожної лінії. Панкреатичні острівці класифікували за їхньою площею: маленькі острівці – до 1500 мкм<sup>2</sup>, середні – 1500–3500 мкм<sup>2</sup>, великі – 3500–7500 мкм<sup>2</sup>, гігантські острівці – понад 7500 мкм<sup>2</sup> [6–8]. Крім того, у тканині підшлункової виділяли поодинокі ендокриноцити, що не формують острівці.

Результати статистично опрацювали в Excel Office365. Вірогідними вважали відмінності між порівнюваними параметрами при  $p < 0,05$  за  $t$ -критерієм Стьюдента. Показники в таблицях наведено як середня статистична величина та її помилка ( $M \pm m$ ), на графіках – як середня статистична величина та її довірчий інтервал.



**Рис. 1.** Щільність островців різних типів на 1 см<sup>2</sup> зрізу підшлункової залози.

**1:** поодинокі ендокриноцити;  
**S:** маленькі;  
**M:** середні;  
**L:** великі,  
**G:** гігантські островці.



**Рис. 2.** Площа (мм<sup>2</sup>), яку займають островці, та імунореактивність до інсуліну та глюкагону на 1 см<sup>2</sup> тканини підшлункової залози.

## Результати

Планіметричний аналіз виявив панкреатичні островці всіх типів у тканині підшлункової залози щурів ліній SHR і Wistar (рис. 1). Зазначимо, що у гіпертензивних тварин лінії SHR кількість одиничних ендокриноцитів в 2,3 раза більша ( $p < 0,001$ ), а гігантських островців – на 34,2 % більша ( $p < 0,001$ ), ніж у нормотензивних щурів лінії Wistar. У щурів лінії SHR істотно знижена кількість островців середньої (на 43,1 %) та великої (на 54,7 %) площі.

Серед панкреатичних островців виділялися островці, що включали тільки інсулін-вмісні  $\beta$ -клітини,  $\alpha$ -клітини, а також «класичний» тип островців зі спільною популяцією ендокриноцитів обох типів. Звернули увагу на наявність в островцях дубль-імунопозитивних зон забарвлення деяких ендокриноцитів, що свідчить про вміст інсуліну та глюкагону в одній клітині. Виявили певні відмінності за формуванням структури островців у нормотензивних і гіпертензивних щурів (табл. 1).

Для отримання виваженої статистичної оцінки кількості імунореактивного матеріалу до інсуліну та глюкагону в підшлунковій залозі обрахували показник сумарної площі панкреатичних островців (Islet), площі, яку в залозі займає інсулін (insulin), глюкагон (glucagon) і дубль-імунопозитивне забарвлення (dbl-positive) (рис. 2).

Результати свідчать: незважаючи на відмінності розподілу островців різних розмірів, сумарна площа ендокринної частини підшлункової залози у гіпертензивних щурів лінії SHR не відрізнялася від показників нормотензивних тварин лінії Wistar і становила 1,4 % від площі зрізу залози. Детальніший аналіз планіметричної організації панкреатичних островців (табл. 2) показав, що основна площа ендокринної частини підшлункової залози гіпертензивних щурів лінії SHR представлена островцями гігантського розміру, на відміну від нормотензивних щурів лінії Wistar. Зазначимо, що у щурів лінії SHR сумарна площа матеріалу, імунореактивного до інсуліну, на 16,9 % більша ( $p < 0,001$ ), ніж у щурів лінії Wistar, а її основна частина локалізована в гігантських островцях. Параметри імунореактивності до глюкагону майже не відрізнялися у ліній тварин, що досліджували.

Певний науковий інтерес викликає наявність у деяких ендокриноцитах ділянок, що мають імунореактивність одразу до двох гормонів – інсуліну та глюкагону. Такі ділянки визначили в островцях усіх типів обох ліній щурів, однак сумарні показники у гіпертензивних щурів лінії SHR на 21,8 % нижчі ( $p < 0,001$ ), ніж у нормотензивних щурів лінії Wistar.

**Таблиця 1.** Відносний розподіл панкреатичних острівців у підшлунковій залозі щурів лінії Wistar (чисельник) і SHR (знаменник), %

Типи острівців	Усі острівці	Поодинокі ендокриноцити	Маленькі острівці, <1500 мкм <sup>2</sup>	Середні острівці, 1500–3500 мкм <sup>2</sup>	Великі острівці, 3500–7500 мкм <sup>2</sup>	Гігантські острівці, >7500 мкм <sup>2</sup>
Всі острівці	100,00	<u>14.66</u> 32,68	<u>37.70</u> 40,55	<u>23.04</u> 8,27	<u>16.23</u> 7,09	<u>8.38</u> 11,42
Інсулін-вмісні	<u>8.90</u> 3,15	<u>3.14</u> 1,97	<u>2.62</u> 1,18	<u>1.57</u> 0,00	<u>1.57</u> 0,00	<u>0.00</u> 0,00
Інсулін- і глюкагон-вмісні	<u>80.10</u> 62,99	<u>1.57</u> 2,76	<u>34.03</u> 33,46	<u>21.47</u> 8,27	<u>14.66</u> 7,09	<u>8.38</u> 11,42
Глюкагон вмісні	<u>10.99</u> 33,86	<u>9.95</u> 27,95	<u>1.05</u> 5,91	<u>0.00</u> 0,00	<u>0.00</u> 0,00	<u>0.00</u> 0,00
Дубль-позитивні	<u>39.79</u> 59,45	<u>1.57</u> 2,76	<u>12.57</u> 30,31	<u>10.47</u> 7,87	<u>6.81</u> 7,09	<u>8.38</u> 11,42
Дубль-негативні	<u>60.21</u> 40,55	<u>13.09</u> 29,92	<u>25.13</u> 10,24	<u>12.56</u> 0,39	<u>9.42</u> 0,00	<u>0.00</u> 0,00

**Таблиця 2.** Площа матеріалу, імунореактивного до інсуліну та глюкагону, в острівцях різного типу на 100 см<sup>2</sup> тканини підшлункової залози щурів лінії Wistar (чисельник) та SHR (знаменник)

Площа, мм <sup>2</sup>	Всі острівці	Поодинокі ендокриноцити	Маленькі острівці, <1500 мкм <sup>2</sup>	Середні острівці, 1500-3500 мкм <sup>2</sup>	Великі острівці, 3500-7500 мкм <sup>2</sup>	Гігантські острівці, >7500 мкм <sup>2</sup>
Острівців	<u>139.52 ± 0.94</u> 140,11 ± 0,82*	<u>0.34 ± 0.01</u> 0,79 ± 0,04*	<u>13.33 ± 0.72</u> 10,53 ± 0,56*	<u>25.22 ± 1.09</u> 8,58 ± 0,20*	<u>34.18 ± 1.23</u> 16,83 ± 0,38*	<u>66.44 ± 1.65</u> 103,37 ± 2,95*
Імунореактивності до інсуліну	<u>79.23 ± 0.54</u> 92,26 ± 5,53*	<u>0.27 ± 0.01</u> 1,00 ± 0,05*	<u>8.08 ± 0.44</u> 7,76 ± 0,41	<u>16.24 ± 0.70</u> 5,72 ± 0,14*	<u>18.89 ± 0.68</u> 10,53 ± 0,24*	<u>35.76 ± 0.89</u> 67,61 ± 1,93*
Імунореактивності до глюкагону	<u>20.38 ± 0.14</u> 20,72 ± 0,15	<u>0.20 ± 0.01</u> 0,47 ± 0,01*	<u>2.86 ± 0.15</u> 2,68 ± 0,14	<u>5.13 ± 0.22</u> 1,43 ± 0,03*	<u>3.77 ± 0.13</u> 2,63 ± 0,06*	<u>8.46 ± 0.21</u> 13,52 ± 0,39*
Дубль-позитивної імунореактивності	<u>6.76 ± 0.05</u> 4,62 ± 0,03*	<u>0.18 ± 0.01</u> 0,36 ± 0,01*	<u>1.52 ± 0.08</u> 1,04 ± 0,05*	<u>1.89 ± 0.08</u> 0,33 ± 0,01*	<u>0.97 ± 0.03</u> 0,32 ± 0,01*	<u>2.21 ± 0.05</u> 2,57 ± 0,07*

\*: вірогідність відмінностей  $p < 0,05$ .

## Обговорення

Як відомо, ендокринна частина підшлункової залози лабораторних щурів становить 1–2 % усього об'єму підшлункової залози [5,11]. Багато авторів наголошують на неоднорідності панкреатичних острівців, розміри яких варіюють у широких межах [6–8]; це може впливати на кількісні показники пулу ендокриноцитів в острівцях різних типів. Так, під час дослідження ендокринного апарату підшлункової залози в нормоглікемічних гіпертензивних щурів лінії SHR із порушеною толерантністю до глюкози виявили ремоделювання ендокринного апарату, що супроводжується зменшенням кількості β-клітин і збільшенням пулу α-клітин у панкреатичних острівцях [8–10].

Метод подвійного імуофлуоресцентного забарвлення ендокриноцитів, що використали у цьому дослідженні, дав змогу уточнити планіметричну організацію ендокринного апарату підшлункової залози. Так, виявили, що ендокринна частина підшлункової залози щурів ліній Wistar і SHR має подібні кількісні показники та становить 1,4 % від площі перетину підшлункової залози. У структурі підшлункової залози гіпертензивних щурів лінії SHR визначили зменшення частки острівців, що складаються тільки з β-клітин, при збільшенні кількості

острівців, що складаються лише з α-клітин (табл. 1). У підшлунковій залозі щурів лінії SHR площа матеріалу, імунореактивного до інсуліну, на 16,8 % більша, ніж у щурів лінії Wistar (табл. 2).

Одне з припущень, що пояснює ремоделювання панкреатичних острівців у гіпертензивних щурів лінії SHR, – імовірність порушення модуляції транскрипційного фактора Neurogenin3 (NGN3) у гістогенезі, який реалізує стратегію диференціювання ембріональних ендокриноцитів в окремі лінії β- та α-клітин [12]. Можливо, під впливом транскрипційних факторів Brn-4 [13] та/або Arx [14] формується переважання α-клітинного фенотипу на острівцях. При цьому можливе зменшення утворення ключових регуляторів β-ендокриноцитів, як-от Nkx6.1, Neurogenin3 та Pdx1 [15]; це може спричинити депресію пулу β-клітин у щурів лінії SHR.

Реципрокний взаємозв'язок транскрипційних регуляторів гістогенезу панкреатичних ендокриноцитів виявляється тим, що зменшення експресії гена інсуліну та пов'язаних із ним факторів транскрипції призводить до збільшення експресії транскрипційних факторів, що активують ген глюкагон – Pax6, Foxa1 і Foxa2 [16]. Можливою реалізацією дисбалансу транскрипційних факторів регуляції функціонального стану ендокриноци-



тів підшлункової залози в разі формування гіпертензії в щурів лінії SHR є зменшення частки «класичних» панкреатичних острівців, які містять частину  $\beta$ -клітин, що домінує, та мінорну частку  $\alpha$ -клітин, а також зменшення площі острівців із дубль-позитивним забарвленням на інсулін і глюкагон.

## Висновки

1. Планіметричний аналіз показав, що панкреатичні острівці в нормотензивних щурів лінії Wistar і гіпертензивних щурів лінії SHR становлять 1,4 % від площі перетину підшлункової залози та представлені острівцями різних розмірів, які, крім «класичного» складу ендокриноцитів, можуть складатися тільки з  $\beta$ -клітин або тільки з  $\alpha$ -клітин.

2. У гіпертензивних щурів лінії SHR у залозі на 16,9 % більша сумарна площа матеріалу, імунореактивного до інсуліну, але його основна частина локалізована в гігантських острівцях або представлена імунореактивністю одиничних  $\beta$ -ендокриноцитів.

3. На відміну від щурів лінії Wistar у підшлунковій залозі гіпертензивних щурів лінії SHR суттєво збільшена кількість одиничних  $\alpha$ -ендокриноцитів і маленьких острівців, що складаються лише з  $\alpha$ -клітин.

**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 медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0001-6617-5178](https://orcid.org/0000-0001-6617-5178)

## Information about author:

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

## Список літератури

- [1] Intra-islet lesions and lobular variations in beta-cell mass expansion in ob/ob mice revealed by 3D imaging of intact pancreas / S. Parveen, E. Kostromina, C. Nord et al. *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6, Iss. 34885. P. 1-11. <https://doi.org/10.1038/srep34885>
- [2] Wang L. J., Kaufman D. B. Digital Image Analysis to Assess Quantity and Morphological Quality of Isolated Pancreatic Islets. *Cell transplantation*. 2016. Vol. 25, Iss. 7. P. 1219-1225. <https://doi.org/10.3727/096368915X689947>
- [3] Rickels M. R., Robertson R. P. Pancreatic Islet Transplantation in Humans: Recent Progress and Future Directions. *Endocrine reviews*. 2019. Vol. 40, Iss. 2. P. 631-668. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00154>
- [4] Campbell-Thompson M., Tang S. C. Pancreas Optical Clearing and 3-D Microscopy in Health and Diabetes. *Frontiers in endocrinology*. 2021. Vol. 12. P. 644826. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.644826>
- [5] Pancreatic beta cell/islet mass and body mass index / M. P. Dybala, S. K. Olehnik, J. L. Fowler et al. *Islets*. 2019. Vol. 11, Iss. 1. P. 1-9. <https://doi.org/10.1080/19382014.2018.1557486>
- [6] Абрамов А. В., Тихоновская М. А., Колесник Ю. М. Особенности влияния хронического пренатального стресса на структурно-функциональную организацию бета-эндокриноцитов. *Клінічна та експериментальна патологія*. 2004. Т. 3, № 2. С. 176-179.
- [7] Іваненко Т. В. Влияние гипоксических тренировок на функцию бета-клеток панкреатических островков. *Актуальні проблеми*

*сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії*. 2011. Т. 11. № 4. С. 82-84.

- [8] Abramova T. V. The distribution of the islets of Langerhans in pancreas of euglycemic spontaneously hypertensive rats. *Патологія*. 2016. Т. 13, № 1. С. 19-21. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2016.1.72359>
- [9] Abramova T. V., Kolesnyk Yu. M. The features of beta-cells organization in the pancreas of spontaneously hypertensive rat (SHR). *Патологія*. 2016. Т. 13, № 3. С. 4-8. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2016.3.86931>
- [10] Абрамова Т. В., Колесник Ю. М. Особенности организации популяции альфа-клеток в поджелудочной железе у крыс со спонтанной гипертензией (SHR). *Патологія*. 2017. Т. 14, № 2. С. 124-128. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2017.2.109249>
- [11] Islet architecture: A comparative study / A. Kim, K. Miller, J. Jo et al. *Islets*. 2009. Vol. 1, Iss. 2. P. 129-136. <https://doi.org/10.4161/isl.1.2.9480>
- [12] Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice / F. J. Naya, H. P. Huang, Y. Qiu et al. *Genes & development*. 1997. Vol. 11, Iss. 18. P. 2323-2334. <https://doi.org/10.1101/gad.11.18.2323>
- [13] Hussain M. A., Miller C. P., Habener J. F. Brn-4 transcription factor expression targeted to the early developing mouse pancreas induces ectopic glucagon gene expression in insulin-producing beta cells. *The Journal of biological chemistry*. 2002. Vol. 277, Iss. 18. P. 16028-16032. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107124200>
- [14] Unger R. H., Cherrington A. D. Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiological and therapeutic makeover. *The Journal of clinical investigation*. 2012. Vol. 122, Iss. 1. P. 4-12. <https://doi.org/10.1172/JCI60016>
- [15] Іваненко Т. В., Винокурова А. В. Ключові молекулярно-генетичні регулятори диференціювання ендокриноцитів підшлункової залози. *Клінічна та експериментальна патологія*. 2021. Т. 20, № 4. С. 112-117. <https://doi.org/10.24061/1727-4338.XX.4.78.2021.15>
- [16] Gosmain Y., Masson M. H., Philippe J. Glucagon: the renewal of an old hormone in the pathophysiology of diabetes. *Journal of diabetes*. 2013. Vol. 5, Iss. 2. P. 102-109. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12022>

## References

- [1] Parveen, S., Kostromina, E., Nord, C., Eriksson, M., Lindstrom, P., & Ahlgren, U. (2016). Intra-islet lesions and lobular variations in beta-cell mass expansion in ob/ob mice revealed by 3D imaging of intact pancreas. *Scientific Reports*, 6(34885), 1-11. <https://doi.org/10.1038/srep34885>
- [2] Wang, L. J., & Kaufman, D. B. (2016). Digital Image Analysis to Assess Quantity and Morphological Quality of Isolated Pancreatic Islets. *Cell transplantation*, 25(7), 1219-1225. <https://doi.org/10.3727/096368915X689947>
- [3] Rickels, M. R., & Robertson, R. P. (2019). Pancreatic Islet Transplantation in Humans: Recent Progress and Future Directions. *Endocrine reviews*, 40(2), 631-668. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00154>
- [4] Campbell-Thompson, M., & Tang, S. C. (2021). Pancreas Optical Clearing and 3-D Microscopy in Health and Diabetes. *Frontiers in endocrinology*, 12, 644826. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.644826>
- [5] Dybala, M. P., Olehnik, S. K., Fowler, J. L., Golab, K., Millis, J. M., Golebiewska, J., Bachul, P., Witkowski, P., & Hara, M. (2019). Pancreatic beta cell/islet mass and body mass index. *Islets*, 11(1), 1-9. <https://doi.org/10.1080/19382014.2018.1557486>
- [6] Abramov, A. V., Tikhonovskaya, M. A., & Kolesnik, Yu. M. (2004). Osobennosti vliyaniya khronicheskogo prenatal'nogo stressa na strukturno-funktsional'nyuyu organizatsiyu beta-endokrinotsitov [Features of the influence of chronic prenatal stress on the structural and functional organization of beta-endocrinocytes]. *Klinichna ta eksperymentalna patolohiia*, 3(2), 176-179. [in Russian].
- [7] Іваненко, Т. В. (2011). Vliyaniye gipoksicheskikh trenirovok na funktsiyu beta-kletok pankreaticheskikh ostrovkov [Effect of hypoxic training on functioning of pancreatic islet beta-cells]. *Aktualni problemy suchasnoi medytsyny: Visnyk Ukrainskoi medychnoi stomatolohichnoi akademii*, 11(4), 82-84. [in Russian].
- [8] Abramova, T. V. (2016). The distribution of the islets of Langerhans in pancreas of euglycemic spontaneously hypertensive rats. *Pathologia*, 13(1), 19-21. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2016.1.72359>
- [9] Abramova, T. V., & Kolesnyk, Yu. M. (2016). The features of beta-cells organization in the pancreas of spontaneously hypertensive rat (SHR). *Pathologia*, 13(3), 4-8. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2016.3.86931>

- [10] Abramova, T. V., & Kolesnyk, Yu. M. (2017). Osobennosti organizatsii populyatsii al'fa-kletok v podzheludochnoi zheleze u krysov s spontannoi gipertenzii (SHR) [Features of the alpha-cell population organization in pancreas of spontaneously hypertensive rats (SHR)]. *Pathologia*, 14(2), 124-128. [in Russian]. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2017.2.109249>
- [11] Kim, A., Miller, K., Jo, J., Kilimnik, G., Wojcik, P., & Hara, M. (2009). Islet architecture: A comparative study. *Islets*, 1(2), 129-136. <https://doi.org/10.4161/isl.1.2.9480>
- [12] Naya, F. J., Huang, H. P., Qiu, Y., Mutoh, H., DeMayo, F. J., Leiter, A. B., & Tsai, M. J. (1997). Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes & development*, 11(18), 2323-2334. <https://doi.org/10.1101/gad.11.18.2323>
- [13] Hussain, M. A., Miller, C. P., & Habener, J. F. (2002). Brn-4 transcription factor expression targeted to the early developing mouse pancreas induces ectopic glucagon gene expression in insulin-producing beta cells. *The Journal of biological chemistry*, 277(18), 16028-16032. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107124200>
- [14] Unger, R. H., & Cherrington, A. D. (2012). Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover. *The Journal of clinical investigation*, 122(1), 4-12. <https://doi.org/10.1172/JCI60016>
- [15] Ivanenko, T. V., & Vynokurova, A. V. (2021) Kliuchovi molekularno-henetychni rehulatory dyferentsiiuvannia endokrynotsytiv pidshlunkovoi zalozy [Key molecular genetic regulators of pancreatic endocrinocyte differentiation]. *Klinichna ta eksperymentalna patohiia*, 20(4), 112-117. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.24061/1727-4338.XX.4.78.2021.15>
- [16] Gosmain, Y., Masson, M. H., & Philippe, J. (2013). Glucagon: the renewal of an old hormone in the pathophysiology of diabetes. *Journal of diabetes*, 5(2), 102-109. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12022>



# Effectiveness of antiviral treatment of patients with chronic hepatitis C GT 1b depending on the presence of comorbid chronic renal insufficiency

H. V. Venytska<sup>ID</sup><sup>B,C,D</sup>, O. V. Ryabokon<sup>ID</sup><sup>\*A,E,F</sup>

Zaporizhzhia State Medical 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.** The aim of the work was to analyze the effectiveness of antiviral therapy (3D mode) in patients with chronic hepatitis C (CHC) GT1 in clinical practice, depending on the presence of comorbid chronic renal insufficiency stage V, who receiving hemodialysis.

**Materials and methods.** 101 patients with CHC GT1 who received antiviral therapy (AVT) according to the scheme OBV/PTV/r + DSV ± RBV (3D-mode) during 12 weeks were included in the study. All patients with CHC were divided into two groups depending on the presence of comorbid chronic renal insufficiency (CRI): 92 patients who did not have accompanying CRI and 9 patients with comorbid CRI stage V who received program hemodialysis.

**Results.** The effectiveness of antiviral therapy in patients with CHC GT1 according to the OBV/PTV/r + DSV ± RBV scheme in clinical practice was high in terms of the achievement of 12 weeks sustained virologic response (SVR 12) SVR 12 (94.1 %). The frequency of achieving SVR 12 in CHC patients without concomitant CRI was 94.6 %, and with of comorbid CRI stage V (hemodialysis) – 88.9 % and had not statistically significant differences ( $P > 0.05$ ). Treatment according to the 3D-mode was accompanied with stable normalization of ALT activity in 86.0 % of patients with CHC, and the frequency of it is achievement did not depend on the presence of comorbid CRI stage V (100.0 % vs. 85.2 % in patients without the specified concomitant pathology,  $P > 0.05$ ).

**Conclusions.** The effectiveness of antiviral therapy in patients with CHC GT1 according to the OBV/PTV/r + DSV ± RBV scheme in clinical practice is high in terms of the achievement of SVR 12 (94.1 %) and does not depend in the presence of comorbid CRI stage V in the patient (94.6 % vs. 88.9 %,  $P > 0.05$ ). The severity of liver fibrosis does not affect the effectiveness of AVT in patients with CHC GT1 in the presence of comorbid CRI stage V and without this comorbid condition.

**Key words:** chronic hepatitis C, viral infection, comorbidity, chronic renal insufficiency, hemodialysis, antiviral treatment.

**Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 301–306**

## Ефективність протівірусного лікування хворих на хронічний гепатит С GT 1b залежно від наявності коморбідної хронічної ниркової недостатності

Г. В. Веницька, О. В. Рябоконт

**Мета роботи** – проаналізувати ефективність протівірусної терапії (3D-режим) в клінічній практиці у хворих на хронічний гепатит С (ХГС) GT1, які отримують гемодіаліз, залежно від наявності коморбідної хронічної ниркової недостатності V стадії.

**Матеріали та методи.** У дослідження залучили 101 хворого на ХГС GT1, які отримували протівірусну терапію (ПВТ) за схемою OBV/PTV/r + DSV ± RBV (3D-режим) тривалістю 12 тижнів. Залежно від наявності коморбідної хронічної ниркової недостатності (ХНН) усіх хворих на ХГС поділили на групи: 92 пацієнти, які не мали супутньої ХНН, та 9 осіб із коморбідною ХНН V стадії, котрі отримували програмний гемодіаліз.

**Результати.** У результаті дослідження доведено, що ефективність ПВТ у хворих на ХГС GT1 за схемою OBV/PTV/r + DSV ± RBV у клінічній практиці виявилася високою за показником досягнення 12-тижневої стійкої вірусологічної відповіді (СВВ 12) – 94,1 %. Частота досягнення СВВ 12 у хворих на ХГС без супутньої ХНН становила 94,6 %, а в разі коморбідної ХНН V стадії (гемодіаліз) – 88,9 %, не мала статистично значущих розбіжностей ( $p > 0,05$ ). Лікування за 3D-режимом супроводжувалося стійкою нормалізацією активності АлАТ у 86,0 % пацієнтів із ХГС, а частота її досягнення не залежала від наявності коморбідної ХНН V стадії (100,0 % проти 85,2 % у хворих без цієї супутньої патології,  $p > 0,05$ ).

**Висновки.** Ефективність ПВТ хворих на ХГС GT1 за схемою OBV/PTV/r + DSV ± RBV у клінічній практиці є високою за показником досягнення СВВ 12 (94,1 %) і не залежить від наявності у пацієнта коморбідної ХНН V стадії (94,6 % проти 88,9 %,  $p > 0,05$ ).

### ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/265483>

UDC 616.36-002.1-06:616.61-008.6]-085.281.8-036.8

DOI: [10.14739/2409-2932.2022.3.265483](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2022.3.265483)

**Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 301–306**

**Key words:** chronic hepatitis C, viral infection, comorbidity, chronic renal insufficiency, hemodialysis, antiviral treatment.

\*E-mail: [ryabokon.zsmu@ukr.net](mailto:ryabokon.zsmu@ukr.net)

Received: 10.08.2022 // Revised: 31.08.2022 // Accepted: 09.09.2022

Ступінь виразності фіброзу печінки не впливає на ефективність ПВТ у хворих на ХГС GT1 і при коморбідній ХНН V стадії, і без цього коморбідного стану.

**Ключові слова:** хронічний гепатит С, вірусна інфекція, коморбідність, хронічна ниркова недостатність, гемодіаліз, протівірусне лікування.

**Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2022. Т. 15, № 3(40). С. 301–306**

Chronic hepatitis C (CHC) is a widespread viral infection and one of the main causes of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma [1]. According to World Health Organization (WHO) estimates, between 500 million and 1 billion people are infected with hepatitis C virus (HCV). The prevalence of chronic liver disease associated with HCV is currently about 200 million and 3–4 million new infected people join to them every year [2]. According to EASL experts, despite the availability of effective treatment regimens using direct antiviral drugs about 400000 people die annually from liver diseases associated with CHC [3]. According to the Center of Public Health of Ukraine, as of January 1, 2019, 3.6 % of the Ukraine population had a confirmed diagnosis of CHC, which indicates an average level of infection [2,4].

The main risk groups for HCV-infection are recipients of blood and their components, persons who receive invasive procedures for a long time, in particular, hemodialysis [5,6]. World experience shows that there is a high probability of infection with the hepatitis B virus and HCV precisely under the condition of receiving hemodialysis [7]. Data from the literature show that in European countries, the prevalence of HCV-infected patients in hemodialysis centers ranges from 2 % to 34 %. The lowest rate of infection is in Great Britain – 2 % and Switzerland – 5.7 %, and the highest rates are in Italy – 27 %, Poland – 29 % and Romania – 34 % [8–10]. In Saudi Arabia, when analyzing the prevalence of HCV-infection among patients of hemodialysis centers, it was found that 41.9–45.5 % of patients have positive anti-HCV. This was explained by a long stay on systemic hemodialysis (>4 years) and previous blood transfusions (>5) [11,12]. In Japan, the frequency of detection of anti-HCV was analyzed in patients with chronic renal insufficiency (CRI) stage V based on 18 hemodialysis centers. It was found that 22.2 % were seropositive, and the prevalence of HCV-infection clearly depended on the hemodialysis duration [13]. Numerous researchers of this problem are sure that 90–95 % of patients who initially enter program hemodialysis do not have hepatitis markers, and infection occurs only during their treatment [10,14–16].

In Ukraine, the frequency of anti-HCV detection among patients in specialized departments of various profiles is about 6.9 %, while in the dialysis population this indicator is almost 4 times higher – 27.5 % [16]. An analysis of the frequency of infection with viral hepatitis in hemodialysis units under the state program in Ukraine was conducted. It was found that 61.4 % of patients had blood-contact viral hepatitis markers (HBsAg – 16.4 %, anti-HCV – 45.0 %). It was proven that the length of patients stay on programmed hemodialysis has a direct relationship with the frequency of viral hepatitis markers detection. If the treatment time is up to 1 year, then

infection was determined in 38.4 % of patients, and with hemodialysis for 2–3 years – in 59.2 % of patients, and with hemodialysis for more than 5 years – in 68.8 % of patients. At the same time, HCV mono-infection was detected in 17.4 % of patients who were treated with programmed hemodialysis for up to 1 year, and in 40.6 % of patients with a duration of hemodialysis more than 5 years [10]. A clear correlation is observed between the level of HCV-infection and the number of received hemodialysis sessions. A statistically significant difference in the frequency of infection with hemocontact viral hepatitis is observed in groups of patients who received up to 50 sessions, from 50 to 200 and more than 200 sessions of hemodialysis. After 200 program hemodialysis procedures (approximately after 2 years), 57.5 % of patients were found to be anti-HCV positive [16].

Comorbidity of CHC and CRI stage V, who receive hemodialysis, aggravates the course of the main and comorbid diseases [14,15]. According to data from a meta-analysis of seven observational studies, which included 11 589 patients with CRI stage V and received programmed hemodialysis, a statistically significantly higher mortality rate was recorded among patients seropositive for anti-HCV than among patients without concomitant HCV. Even, in these patients liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma were identified as one of the main causes of death [14,17].

With the advent of new antiviral drugs with a direct mechanism of action, the implementation of the WHO global strategy became possible. The purpose was to eliminate agents of viral hepatitis as a threat to public health [2]. Due to significant changes in the strategy of antiviral therapy (AVT) of patients with HCV from interferon-containing to interferon-free regimens [18–21], the possibility of the HCV micro-elimination has appeared in certain groups of patients, in particular and in patients with CRI stage V receiving programmed hemodialysis [22–25].

Previously, in presence of only interferon-containing regimens, the treatment of HCV patients with comorbid CRI was significantly limited. It is known that with normal kidney function, the half-life of interferon after subcutaneous injection is about 2–4 hours. Then filtration in the glomeruli of the kidneys followed by reabsorption in the tubules of the kidneys, where proteolytic degradation of the molecule occurs. Kidneys have the main role in the metabolism of interferon [18,19]. In patients with CRI stage V who receive hemodialysis, there is a significant violation of the removal of the interferon molecule and its accumulation. This provokes the appearance of serious side effects and makes it impossible to conduct interferon-containing therapy [18–20].

The emergence of interferon-free treatment regimens, namely the 3D-mode, made it possible to perform AVT

in patients with CHC GT1 with comorbid CRI stage V who are receiving hemodialysis [21–26]. The 3D regimen is a combination of ombitasvir (OBV), paritaprevir boosted with ritonavir (PTV/r) and dasabuvir (DSV), with the addition of ribavirin (RBV) in CHC patient with severe liver fibrosis (F 3–4). The mechanism of action of ombitasvir, paritaprevir and dasabuvir consists in inhibition of non-structural protein 3/4 A protease and the ability to inhibit non-nucleoside polymerase of non-structural protein 5B, respectively. The combination of these active substances makes it possible to achieve high AVT efficiency in patients from difficult categories, for example, with liver cirrhosis and after liver transplantation [27]. The antiviral activity of paritaprevir is enhanced due to the combination with ritonavir, which makes it possible to use the drug once a day and in a lower dosage. Paritaprevir is metabolized by cytochrome P450 (CYP) 3A4, and ritonavir is the main inhibitor of this enzyme [29]. HCV patients with comorbid CRI of any stage do not increase the exposure of these drugs with direct antiviral action to a clinically significant degree (changes <50 %), therefore, do not require dose adjustment [21,28].

According to randomized studies in the general population of CHC patients, the 3D-mode demonstrates high (>95 %) efficiency [27–29]. Therefore, today it is relevant to find out its effectiveness in everyday clinical practice, for example, in patients with hemodialysis.

## Aim

The aim of the work was to analyze the effectiveness of antiviral therapy (3D mode) in clinical practice in patients with chronic hepatitis C GT1, depending on the presence of comorbid chronic renal insufficiency stage V, receiving hemodialysis.

## Materials and methods

In the study 101 patients with CHC GT1 were included. There were examined and treated at the hepatological center of the Municipal Non-Profit Enterprise “Regional Infectious Diseases Clinical Hospital” of Zaporizhzhia Regional Council. The age ranged from 27 to 72 years, the median age was 54.0 (43.0; 61.0) years old, 45 men and 56 women were included in the study. Duration of CHC from the moment of laboratory confirmation of the diagnosis was 8.0 (2.0; 13.0) years. In all patients, GT1 HCV-infection was confirmed by the polymerase chain reaction (PCR) method and the viral load was determined before the start of treatment. The median viral load was 253 500 (48 333; 1 000 000) IU/ml. At the same time, a high viral load (>400 000 IU/ml) was detected in 39 (38.6 %), a low (<400 000 IU/ml) in 62 (61.4 %), respectively (EASL 2018). Necrotic-inflammatory activity in the liver was assessed by the level of increased alanine aminotransferase (ALT) according to the classification of chronic hepatitis (Los Angeles, 1994). The severity of liver fibrosis was determined for all patients based on the results

of the liver fibroelastometry. Severe liver fibrosis with transformation into liver cirrhosis F 3–4 was detected in 44 (43.6 %) patients, in 57 (56.4 %) patients stage of liver fibrosis F 0–2 was confirmed.

All patients were examined and received AVT according to the scheme OBV/PTV/r + DSV ± RBV (3D mode) lasting 12 weeks as part of the State target program in accordance with the Unified clinical protocol of primary, secondary (specialized) medical care, tertiary (highly specialized) medical care help with viral hepatitis C in accordance with the Order of the Ministry of Health of Ukraine No. 729 dated 18.07.2016. AVT efficacy was assessed per protocol at the end of treatment and at 12 weeks to assess sustained virologic response (SVR 12).

Depending on the presence of comorbid CRI, all patients with CHC were divided into groups: group I – 92 patients who did not have concomitant CRI, group II – 9 patients with comorbid CRI stage V, who were under the dispensary supervision of a nephrologist and received programmed hemodialysis lasting from 1 up to 14 years (7.2 years on average). Groups of patients did not differ statistically ( $P > 0.05$ ) in terms of gender, age, and level of viral load before the start of treatment.

Statistical data processing was carried out in the program Statistica for Windows 13 (StatSoft Inc., No. JPZ804I382130ARCN10-J).

## Results

According to the results of the study, it was established that the implementation of AVT according to the scheme OBV/PTV/r + DSV ± RBV was accompanied by the negation of HCV-RNA in the blood of most patients as early as the 4<sup>th</sup> week of treatment (95.1 %). This effect persisted even at the end of the therapy, however, when assessing the stability of the virological response, a certain decrease of this parameter was recorded to 94.1 %. A comparison of the frequency of achieving a virological response in CHC patients of the studied groups was made. It was shown that there was no statistically significant difference ( $P > 0.05$ ) in the frequency of HCV-RNA negation in the blood during all observation periods. The frequency of achieving SVR 12 in CHC patients with the presence of comorbid CRI stage V was 88.9 % versus 94.6 % in patients without the specified concomitant pathology ( $P > 0.05$ ) (Table 1).

The dynamics of ALT changes were analyzed, and it was showed – every third patient with HCV had a normal activity level of this enzyme in the blood. The comparative analysis showed that in patients with HCV with comorbid CRI stage V, the normal ALT level in the blood was recorded almost 2 times more often than in patients of group I, however, this difference was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). Subsequently, after 4 weeks of AVT in patients with HCV, an increase in the frequency of achieving ALT normalization from 36.6 % to 77.2 % ( $P < 0.05$ ) was recorded, and at the time of AVT completion to 86.1% ( $P < 0.05$ ). This result was maintained even at the time of SVR 12 assessment (86.0 %). A similar regularity in the dynamics of ALT activity normalization in

**Table 1.** The effectiveness of AVT (3D mode) in patients with CHC GT1 depending on comorbid CRI stage V, abs (%)

Terms observation	CHC patients (n = 101)	CHC patients	
		I group (n = 92)	II group (n = 9)
<b>Negation of HCV-RNA in the blood</b>			
After 4 weeks of AVT	96 (95.1 %)	87 (94.6 %)	9 (100.0 %)
At the time of AVT completion	96 (95.1 %)	87 (94.6 %)	9 (100.0 %)
At the time of the SVR 12 assessment	95 (94.1 %)	87 (94.6 %)	8 (88.9 %)
<b>ALT activity normalization</b>			
Before the start of AVT	37 (36.6 %)	31 (33.7 %)	6 (66.7 %)
After 4 weeks of AVT	78 (77.2 %) <sup>1</sup>	70 (76.1 %) <sup>1</sup>	8 (88.9 %)
At the time of AVT completion	87 (86.1 %) <sup>1,2</sup>	79 (85.9 %) <sup>1,2</sup>	8 (88.9 %)
At the time of the SVR 12 assessment	49 of 57 (86.0 %) <sup>1</sup>	46 of 54 (85.2 %) <sup>1</sup>	9 (100.0 %)

1: the difference is significant, compared to the indicator before the start of AVT in the corresponding group ( $P < 0.05$ ); 2: compared to the indicator after 4 weeks of treatment in the corresponding group ( $P < 0.05$ ).

**Table 2.** AVT virological response (3D mode) with different degrees of liver fibrosis in patients with CHC GT1 depending on comorbid CRI stage V, abs (%)

Observation periods	CHC patients (n = 101)		CHC patients		
			I group (n = 92)		II group (n = 9)
	F 0–2 (n = 57)	F 3–4 (n = 44)	F 0–2 (n = 48)	F 3–4 (n = 44)	F 0–2 (n = 9)
After 4 weeks of AVT	54 (94.7 %)	42 (95.5 %)	45 (93.8 %)	42 (95.5 %)	9 (100.0 %)
At the time of AVT completion	54 (94.7 %)	42 (95.5 %)	45 (93.8 %)	42 (95.5 %)	9 (100.0 %)
At the time of the SVR 12 assessment	53 (93.0 %)	42 (95.5 %)	45 (93.8 %)	42 (95.5 %)	9 (88.9 %)

the blood was noted in the I group of patients. The increase in the frequency of ALT normalization from 33.7 % to 76.1 % ( $P < 0.05$ ), and at the time of AVT completion to 85.9 % ( $P < 0.05$ ) with maintenance of this level 12 weeks after AVT termination (85.2 %). It should be noted that in all (100 %) patients with CHC with the presence of comorbid CRI stage V at the time of SVR 12 evaluation, the ALT activity remained at a normal level (*Table 1*).

According to the results of the virological response analysis in CHC patients with different liver fibrosis stages, it was established that the frequency of formation of SVR 12 did not depend on the liver fibrosis severity ( $P > 0.05$ ) and amounted to 93.0 % in patients with stages F 0–2 and 95.5 % in patients with stages F 3–4. In patients with CHC of the group I who did not have comorbid CRI, this indicator was 93.8 % and 95.5 %, respectively ( $P > 0.05$ ). In patients of the group II who had comorbid CRI stage V, liver fibrosis stages F 0–2 were determined, the SVR 12 frequency was 88.9 % and did not statistically differ from the corresponding indicator of the group I patients (*Table 2*).

Analysis of AVT side effects according to the scheme OBV/PTV/r + DSV ± RBV showed that in no case they did not need to stop AVT, and the frequency of occurrence did not differ statistically ( $P > 0.05$ ) in patients of the studied groups. Thus, patients in the group I had thrombocytopenia (27 out of 92 – 29.3 %), skin itching (9 out of 92 – 9.8 %), and patients in the group II had skin itching and nausea (1 out of 9) in the first weeks of treatment (1 out of 9).

## Discussion

Recently, in the modern literature, there are more and more studies on the use in clinical practice of interferon-free regimens in the treatment of CHC patients with comorbid CRI with an assessment of the effectiveness and safety of this AVT. In some cohort studies, even 100 % effectiveness of using the 3D mode has been demonstrated [22,26]. Thus, the authors [26], while observing CHC patients with CRI stages IV–V who received programmed hemodialysis, after treatment according to the OBV/PTV/r + DSV ± RBV scheme, noted the formation of SVR 12 in all patients (14 out of 14). In the study [22], the formation of SVR was also demonstrated in 100 % (25 out of 25) of HCV patients with comorbid CRI who received hemodialysis. At the same time, it was noted that already on the 4th week of treatment, HCV-RNA negation in the blood occurred [22]. In an American study [21], to assess the safety of the use of the 3D mode (in the treatment of patients with CHC GT1) and the 2D mode (in the treatment of patients with CHC GT4) was studied the impact effect of CRI in different stages on the pharmacokinetics of antiviral drugs, which are included in these regimens. According to the results of this study, it was confirmed that these treatment regimens do not require correction of the drugs dosage in the treatment of patients with CHC and with comorbid CRI in any degree [21].

The majority of studies of the use of 3D mode in clinical practice demonstrate very high efficiency, but not 100 % [23–25]. Thus, as part of the RUBY-1 study, the formation

of SVR 12 was demonstrated in 95 % (18 out of 19) of patients with CHC GT1 and comorbid CRI in the terminal stage [23]. 20 patients without liver cirrhosis were included in this study, and at the time of AVT completion, all patients had negative HCV-RNA in their blood. However, one patient died on day 14 after AVT completion as a result of systolic dysfunction unrelated to AVT, which did not allow SVR 12 assessment in this case. However, a 49 years old patient with F3 liver fibrosis relapsed 4 weeks after AVT completion [23].

Particular attention is drawn to the Spanish study [24], which was conducted 9 centers in Spain and aimed at evaluating the effectiveness of the 3D regimen in patients with HCV both with comorbid CRI and with normal kidney function. According to the results of the study, it was proved that there is no influence of comorbid CRI on the AVT effectiveness in patients with CHC GT1. At the same time, it is the group of CHC patients with comorbid CRI stages IV–V that pay our attention, of which 78.2 % received hemodialysis, 36.9 % of patients had liver cirrhosis, and 45.6 % additionally received RBV. Despite a significant number of patients with high stages of chronic renal insufficiency and severe liver fibrosis, SVR 12 was formed in 95.7 % of patients. At the same time, the researchers noted that during the entire period of AVT, kidney function remained stable, severe side effects were not recorded [24]. The results of our study also established the high efficiency of SVR 12 formation in patients with CHC according to the scheme OBV/PTV/r + DSV ± RBV in clinical practice according to SVR 12 achievement (94.1 %) and the lack of the AVT scheme effectiveness dependence on the presence in patients with CHC GT1 comorbid CRI stage V which receiving hemodialysis (94.6 % vs. 88.9 %,  $P > 0.05$ ). In addition, the treatment side effects that occurred in patients of both studied groups did not lead to the need to stop treatment.

In a multicenter study [25], the absence of liver cirrhosis effect on the SVR 12 achieving was demonstrated. This study included patients with CHC GT1 and GT4 with liver cirrhosis (23 %) and without liver cirrhosis, but in the presence of comorbid CRI stages IV–V. The authors [25] note that SVR 12 was achieved in 95 % of patients, however, in 3 out of 66 patients, AVT was discontinued due to the occurrence of side effects. According to the results of our study, AVT side effects were registered in both studied groups: among patients with comorbid CRI and among patients without concomitant pathology. However, their appearance did not lead to treatment discontinuation. The results of our study showed no effect of liver fibrosis on the frequency of SVR 12 achieving, which is consistent with the data of the previous studies.

## Conclusions

1. The AVT effectiveness in patients with CHC according to the scheme OBV/PTV/r + DSV ± RBV in clinical practice is high in terms of the SVR 12 achievement (94.1 %) and does not depend on the presence of comorbid renal insufficiency stage V (hemodialysis) in the patient (94.6 % versus 88.9 %,  $P > 0.05$ ).

2. Conducting AVT (3D mode) is accompanied by stable ALT activity normalization in 86.0 % of patients with CHC, and the frequency of its achievement does not depend on the presence of comorbid renal insufficiency stage V (100 % versus 85.2 % in patients without the specified concomitant pathology,  $P > 0.05$ ).

3. The frequency of SVR 12 achieving after a course of AVT (3D mode) in patients with CHC does not depend ( $P > 0.05$ ) on the liver fibrosis level in both patient groups: with presence of comorbid renal insufficiency stage V and without this condition.

**Prospects for further research.** In our opinion, it is promising in further studies to determine the factors that affect the risk of recurrence in patients with HCV who received a course of interferon-free AVT regimens.

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

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

## Information about authors:

Venytska H. V., MD, Assistant of the Department of Infectious Diseases, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0002-3642-0117](https://orcid.org/0000-0002-3642-0117)

Riabokon O. V., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Infectious Diseases, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0002-7394-4649](https://orcid.org/0000-0002-7394-4649)

## Відомості про авторів:

Веницька Г. В., асистент каф. інфекційних хвороб, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Рябоконець О. В., д-р мед. наук, професор, зав. каф. інфекційних хвороб, Запорізький державний медичний університет, Україна.

## References

- [1] Khatun, M., Ray, R., & Ray, R. B. (2021). Hepatitis C virus associated hepatocellular carcinoma. *Advances in cancer research*, 149, 103-142. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2020.10.003>
- [2] World Health Organization. (2019). *World Hepatitis Day*. <https://www.who.int/campaigns/world-hepatitis-day/2019/10-messages-for-policy-makers>
- [3] The European Association for the Study of the Liver. (2021). *Eliminating Hepatitis C*. <https://eascampus.eu/webcastyoutube/eliminating-hepatitis-c>
- [4] Public Health Center of the Ministry of Health of Ukraine. (2020, Januar 22). *Virusni hepatyty B ta C yak zahroza hromadskomu zdoroviu* [Viral hepatitis B and C as a threat to public health]. [in Ukrainian]. [https://phc.org.ua/sites/default/files/users/user90/FINAL\\_MSFSF\\_2020\\_22\\_Januar\\_small.pdf](https://phc.org.ua/sites/default/files/users/user90/FINAL_MSFSF_2020_22_Januar_small.pdf)
- [5] Resić, H., Sahović, V., Mesić, E., & Leto, E. (2003). Prevalencija i incidencija serokonverzije hepatitisa C u pacijenata na hemodijalizi [Prevalence and incidence of hepatitis C seroconversion in patients on hemodialysis]. *Acta medica Croatica : casopis Hrvatske akademije medicinskih znanosti*, 57(1), 39-42.
- [6] Dudar, I. O., Palamar, B. I., Krasiuk, E. K., & Loboda, O. M. (2016). Orhanizatsiia medyko-profilaktychnoi dopomohy khvorym nefrolohichnoho profilu u m. Kyievi: Problemy ta shliakhy vyryshennia [Organization nephrologic assistance in Kyiv city: problems and their solutions]. *Ukrainskyi zhurnal nefrologii ta dializu*, (1), 24-31. [in Ukrainian].
- [7] Yakaryilmaz, F., Gurbuz, O. A., Guliter, S., Mert, A., Songur, Y., Karakan, T., & Keles, H. (2006). Prevalence of occult hepatitis B and hepatitis C virus infections in Turkish hemodialysis patients. *Renal failure*, 28(8), 729-735. <https://doi.org/10.1080/08860220600925602>
- [8] Damola, A. B., Adeniji, J. A., & Bakare, A. S. (2019). Hepatitis C virus seropositivity and the risk factors for transmission among blood donors in some selected centers in Lagos State, Southwest Nigeria. *Journal of immunoassay & immunochemistry*, 40(5), 528-539. <https://doi.org/10.1080/15321819.2019.1647853>

- [9] Raina, D., Rawat, N., & Pandita, A. K. (2022). Prevalence of Hepatitis B and Hepatitis C in Patients undergoing hemodialysis at a teaching hospital in Uttarakhand. *Journal of family medicine and primary care*, 11(4), 1348-1353. [https://doi.org/10.4103/jfmpc.jfmpc\\_1017\\_21](https://doi.org/10.4103/jfmpc.jfmpc_1017_21)
- [10] Palamar, B. I. (2015). Hepatyty u khvorykh, yaki likuiutsia hemodializom [Hepatitis in patients treated by hemodialysis]. *Ukrainskyi zhurnal nefrolohii ta dializu*, (2), 55-60. [in Ukrainian].
- [11] Al Nasser, M. N., al Mugeiren, M. A., Assuhaimi, S. A., Obineche, E., Onwabalili, J., & Ramia, S. (1992). Seropositivity to hepatitis C virus in Saudi haemodialysis patients. *Vox sanguinis*, 62(2), 94-97. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1992.tb01177.x>
- [12] Ayoola, E. A., Huraib, S., Arif, M., al-Faleh, F. Z., al-Rashed, R., Ramia, S., al-Mofleh, I. A., & Abu-Aisha, H. (1991). Prevalence and significance of antibodies to hepatitis C virus among Saudi haemodialysis patients. *Journal of medical virology*, 35(3), 155-159. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890350303>
- [13] Yamaguchi, K., Kiyokawa, H., Machida, J., Obayashi, A., Nojiri, N., Ueda, S., & Takatsuki, K. (1994). Seroepidemiology of hepatitis C virus infection in Japan and HCV infection in haemodialysis patients. *FEMS microbiology reviews*, 14(3), 253-258. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00096.x>
- [14] Fabrizi, F., Takkouche, B., Lunghi, G., Dixit, V., Messa, P., & Martin, P. (2007). The impact of hepatitis C virus infection on survival in dialysis patients: meta-analysis of observational studies. *Journal of viral hepatitis*, 14(10), 697-703. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2007.00868.x>
- [15] Fabrizi, F., Messa, P., Basile, C., & Martin, P. (2010). Hepatic disorders in chronic kidney disease. *Nature reviews. Nephrology*, 6(7), 395-403. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2010.37>
- [16] Telehin, D. Ie. (2003). Problema virusnykh hepatytyv u tseentrakh hemodializu [The problem of viral hepatitis in hemodialysis centers]. *Praktychna medytsyna*, 9(3), 91-97. [in Ukrainian].
- [17] Pol, S., Parlati, L., & Jadoul, M. (2019). Hepatitis C virus and the kidney. *Nature reviews. Nephrology*, 15(2), 73-86. <https://doi.org/10.1038/s41581-018-0081-8>
- [18] Al-Freah, M. A., Zeino, Z., & Heneghan, M. A. (2012). Management of hepatitis C in patients with chronic kidney disease. *Current gastroenterology reports*, 14(1), 78-86. <https://doi.org/10.1007/s11894-011-0238-0>
- [19] Wills R. J. (1990). Clinical pharmacokinetics of interferons. *Clinical pharmacokinetics*, 19(5), 390-399. <https://doi.org/10.2165/00003088-199019050-00003>
- [20] Bunchorntavakul, C., Maneerattanaporn, M., & Chavalitdharmrong, D. (2015). Management of patients with hepatitis C infection and renal disease. *World journal of hepatology*, 7(2), 213-225. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i2.213>
- [21] Khatri, A., Dutta, S., Marbury, T. C., Preston, R. A., Rodrigues, L., Wang, H., Awni W., & Menon, R. M. (2017). Pharmacokinetics and Tolerability of Anti-Hepatitis C Virus Treatment with Ombitasvir, Paritaprevir, Ritonavir, with or Without Dasabuvir, in Subjects with Renal Impairment. *Clinical Pharmacokinetics*, 56(2), 153-163. <https://doi.org/10.1007/s40262-016-0429-9>
- [22] Yaraş, S., Üçbilek, E., Özdoğan, O., Ateş, F., Altıntaş, E., & Sezgin, O. (2019). Real-life results of treatment with ombitasvir, paritaprevir, dasabuvir, and ritonavir combination in patients with chronic renal failure infected with HCV in Turkey. *The Turkish journal of gastroenterology*, 30(4), 331-335. <https://doi.org/10.5152/tjg.2018.18269>
- [23] Pockros, P. J., Reddy, K. R., Mantry, P. S., Cohen, E., Bennett, M., Sulkowski, M. S., Bernstein D., Podsadecki T., Cohen D., Shulman N., Wang D., Khatri A., Abunimeh M., & Lawitz, E. (2015). LO1 : Safety of ombitasvir/paritaprevir/ritonavir plus dasabuvir for treating HCV GT1 infection in patients with severe renal impairment or end-stage renal disease: The RUBY-I study. *Journal of Hepatology*, 62, S257. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(15\)30147-1](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(15)30147-1)
- [24] Muñoz-Gómez, R., Rincón, D., Ahumada, A., Hernández, E., Devesa, M. J., Izquierdo, S., Ortiz, M., Hernández-Albujar, A., Fernández-Rodríguez, C., Calvo, M., González, R., Lozano, M., Castellano, G., & Fernández-Vázquez, I. (2017). Therapy with ombitasvir/paritaprevir/ritonavir plus dasabuvir is effective and safe for the treatment of genotypes 1 and 4 hepatitis C virus (HCV) infection in patients with severe renal impairment: A multicentre experience. *Journal of viral hepatitis*, 24(6), 464-471. <https://doi.org/10.1111/jvh.12664>
- [25] Lawitz, E., Gane, E., Cohen, E., Vierling, J., Agarwal, K., Hassanein, T., Mantry, P. S., Pockros, P. J., Bennett, M., Kemmer, N., Morelli, G., Zha, J., Wang, D., Shulman, N. S., Cohen, D. E., & Reddy, K. R. (2018). Efficacy and Safety of Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir in Patients With Hepatitis C Virus Genotype 1 or 4 Infection and Advanced Kidney Disease. *Kidney international reports*, 4(2), 257-266. <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2018.10.003>
- [26] Fabrizi, F., & Messa, P. (2015). Therapy of hepatitis C by direct-acting anti-virals: the end of HCV in dialysis population?. *Expert review of clinical pharmacology*, 8(6), 785-793. <https://doi.org/10.1586/17512433.2015.1086266>
- [27] Poordad, F., Hezode, C., Trinh, R., Kowdley, K. V., Zeuzem, S., Agarwal, K., Shiffman, M. L., Wedemeyer, H., Berg, T., Yoshida, E. M., Forns, X., Lovell, S. S., Da Silva-Tillmann, B., Collins, C. A., Campbell, A. L., Podsadecki, T., & Bernstein, B. (2014). ABT-450/r-ombitasvir and dasabuvir with ribavirin for hepatitis C with cirrhosis. *The New England journal of medicine*, 370(21), 1973-1982. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1402869>
- [28] Badri, P. S., King, J. R., Polepally, A. R., McGovern, B. H., Dutta, S., & Menon, R. M. (2016). Dosing Recommendations for Concomitant Medications During 3D Anti-HCV Therapy. *Clinical pharmacokinetics*, 55(3), 275-295. <https://doi.org/10.1007/s40262-015-0317-8>
- [29] Klibanov, O. M., Gale, S. E., & Santevecchi, B. (2015). Ombitasvir/paritaprevir/ritonavir and dasabuvir tablets for hepatitis C virus genotype 1 infection. *The Annals of pharmacotherapy*, 49(5), 566-581. <https://doi.org/10.1177/1060028015570729>





## Прогностична значущість P-селектину і sST2 у пацієнтів з множинною мієломою

М. О. Панасенко \*<sup>B,C,D</sup>, Б. Б. Самура <sup>A,C,D,E</sup>, С. Я. Доценко <sup>E,F</sup>

Запорізький державний медичний 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

**Мета роботи** – визначити прогностичну цінність біомаркерів P-селектину і sST2 у виникненні кардіоваскулярних подій у пацієнтів із множинною мієломою.

**Матеріали та методи.** У дослідження залучили 67 пацієнтів із діагнозом множинна мієлома в стадії повної або часткової ремісії, середній час спостереження за пацієнтами становив 14,0 (11,4–19,1) місяця. В плазмі крові визначали рівень циркулюючих P-селектину і sST2 за допомогою імунохемилюмінесцентного методу.

**Результати.** Протягом спостереження у 18 (26,9 %) хворих зафіксували 36 кардіоваскулярних подій, а також 2 смерті, що не мали зв'язку з серцево-судинними подіями. Під час дослідження пацієнтів госпіталізували 10 разів через виникнення кардіоваскулярної патології. Хворі на множинну мієлому з кардіоваскулярними подіями мали вищі значення медіани біомаркерів P-селектину ( $p < 0,01$ ) і sST2 ( $p = 0,018$ ) порівняно з пацієнтами без кардіоваскулярних подій.

Результати ROC-аналізу вказують на суттєві предикторні властивості P-селектину та sST2 у виникненні кардіоваскулярних подій протягом 1 року спостереження. На час залучення в дослідження для sST2 на кривій оптимальною точкою поділу є 31,05 нг/мл (чутливість – 71,5 %, специфічність – 89,8 %).

Для P-селектину точкою поділу була концентрація 54,21 нг/мл (чутливість – 69,6 %, специфічність – 86,2 %). Комбінація біомаркерів мала кращі прогностичні властивості порівняно з P-селектином.

**Висновки.** У пацієнтів із підтвердженою множинною мієломою біомаркери P-селектин і sST2 показали суттєві прогностичні властивості щодо виникнення кардіоваскулярних подій впродовж 1 року спостереження.

**Ключові слова:** P-селектин, sST2, кардіоваскулярні події, множинна мієлома, виживання, прогноз.

**Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики.** 2022. Т. 15, № 3(40). С. 307–312

### Prognostic value of P-selectin and sST2 in patients with multiple myeloma

M. O. Panasenko, B. B. Samura, S. Ya. Dotsenko

Cardiac involvement is one of the most important prognostic markers in multiple myeloma. However, prognostic value of novel biomarkers, such as soluble suppression of tumorigenicity 2 (sST2), P-selectin is unknown in multiple myeloma.

**The aim** of the work was to investigate the additive predictive effects of novel biomarkers P-selectin and sST2 for cardiovascular events of multiple myeloma patients.

**Materials and methods.** Levels of P-selectin and sST2 were after anticancer treatment in a total of 67 multiple myeloma patients. The median follow-up duration of the censored cases was 14.0 (11.4–19.1) months. A total of 4 deaths occurred during the follow-up period. ELISA method for measurements of circulating level of P-selectin and sST2 was used.

**Results.** During follow-up, 36 cardiovascular events and 2 deaths unrelated to cardiovascular events were recorded in 18 (26.9 %) patients. During the study, patients were hospitalized 10 times due to cardiovascular disease. At baseline patients with MM and cardiovascular events which appeared during the observation period had higher levels of P-selectin ( $P < 0.01$ ), sST2 ( $P = 0,018$ ), compared to patients without cardiovascular events.

Two novel biomarkers, P-selectin and sST2 showed satisfactory predictive performances for one-year cardiovascular events from ROC analysis. Best cut-off values for predicting one-year cardiovascular events were selected (for sST2 – 31.05 ng/ml, with a sensitivity of 71.5 % and a specificity of 89.8 %; for P-selectin – 54.21 ng/ml, with a sensitivity of 69.6 % and a specificity of 86.2 %). The combination of biomarkers had better prognostic properties compared to P-selectin.

#### ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/266453>

UDC 616.12-02:616-006.44-074/-076

DOI: [10.14739/2409-2932.2022.3.266453](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2022.3.266453)

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 307–312

**Key words:** P-selectin, sST2, cardiovascular risk, multiple myeloma, survival, prognosis.

\*E-mail: [panasenkomari95@gmail.com](mailto:panasenkomari95@gmail.com)

Received: 16.06.2022 // Revised: 23.08.2022 // Accepted: 29.08.2022

**Conclusions.** In patients with confirmed multiple myeloma, the biomarkers P-selectin and sST2 showed significant prognostic properties in the occurrence of cardiovascular events during 1 year of follow-up.

**Key words:** P-selectin, sST2, cardiovascular risk, multiple myeloma, survival, prognosis.

**Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 307–312**

Ураження серцево-судинної системи – один із важливих прогностичних маркерів множинної мієломи. Нещодавно показано, що сучасні режими хіміотерапії під час лікування множинної мієломи покращують загальну виживаність навіть у пацієнтів із кардіоаскулярними ускладненнями [1]. Попередні дослідження вказують на суттєвий зв'язок кардіоаскулярних подій із прогнозом для хворих на множинну мієлому. Це підтверджує необхідність впровадження детальнішої стратифікації ризику пацієнтів із множинною мієломою залежно від ураження серцево-судинної системи.

Останні рекомендації Європейського кардіологічного товариства пропонують діагностичні інструменти для виявлення кардіотоксичності, зокрема біомаркери тропонін I, високочутливий тропонін I, мозковий натрійуретичний пептид (BNP), NT-фрагмент мозкового натрійуретичного пептиду (NT-proBNP). Проте деякі аналітичні системи для визначення тропонінів мають суттєві розбіжності за концентраціями тропонінів у сироватці та плазмі. Результати дослідження, особливо це стосується аналітичних систем першої генерації, можуть залежати від ступеня гепаринізації плазми або сироватки, що є причиною розбіжностей результатів [2]. Відомо, що BNP і NT-proBNP мають суттєву варіативність значень, залежать від коморбідності й ускладнень [3]. Це зумовлює доцільність з'ясування діагностичного значення їхніх змін у хворих на хронічні лімфопроліферативні захворювання в ремісії, коли є фактори ризику несприятливих кардіоаскулярних подій.

Наші попередні дослідження [4,5] вказують на кореляційний зв'язок між виникненням кардіоаскулярних подій і P-селектином, стимулюючим фактором росту, що експресується геном 2 (sST2), у хворих на множинну мієлому. Нові біомаркери з різними патофізіологічними мішенями можуть забезпечити деталізацію стратифікації ризику, і це може сприяти розвитку ризик-адаптованої терапії пацієнтів із множинною мієломою, особливо при ураженні серцево-судинної системи.

## Мета роботи

Визначити прогностичну цінність біомаркерів P-селектину і sST2 у виникненні кардіоаскулярних подій у пацієнтів із множинною мієломою.

## Матеріали і методи дослідження

У дослідження залучили 67 хворих, які досягли регресії множинної мієломи після протипухлинного лікування та не мали прогресії захворювання протягом періоду спостереження [6,7]. Усіх хворих поділили на групи залежно від виникнення кардіоаскулярних подій упродовж усього періоду спостереження.

Гемодинаміку оцінювали, застосовуючи сканер MyLab 50 (Італія) у M- і B-режимах ехолокації датчиком із частотою 2,5–3,5 МГц; використали метод транс-торакальної ехокардіографії. Кінцево-діастолічний і кінцево-систолічний об'єми лівого шлуночка виміряли планіметричним модифікованим методом Сімпсона. Згідно з вимогами Американського товариства ехокардіографії, визначали фракцію викиду лівого шлуночка (ФВ) та індекс регіональної скорочувальної функції лівого шлуночка.

Зразки крові пацієнтів брали вранці (7:00–8:00), визначали концентрацію P-селектину та sST2, попередньо охолодивши силіконові пробірки; здійснювали центрифугування зі швидкістю 6000 об./хв протягом 15 хвилин. Надалі плазму крові заморожували, зберігали за температури не вище ніж -35 °С. Концентрацію sST2 визначили, використавши набори Critical Diagnostics (USA), кат. номер BC-1065E. Для встановлення рівня P-селектину застосували набори eBioscience (BenderMedSystems), кат. номер BMS.219-4.

Характеристика пацієнтів наведена в таблиці 1.

Якщо діагностували супутню патологію, призначали лікування згідно з рекомендаціями [8,9]. Так, пацієнтів з артеріальною гіпертензією лікували інгібіторами ангіотензинперетворювального ферменту (ІАПФ) або антагоністами рецепторів до ангіотензину II (АРАII), антиагрегантами, статинами. Метформін отримував пацієнт із цукровим діабетом 2 типу. В групі хворих із кардіоаскулярними подіями частіше застосовували ІАПФ, діуретики,

Після залучення в дослідження пацієнти здійснювали візити щомісяця протягом 1 року. Під час цих візитів фіксували кардіоаскулярні події: коронарні ішемічні події (інфаркт міокарда, нестабільна стенокардія), транзиторну ішемічну атаку, інсульт, смерть внаслідок будь-якої причини, смерть, спричинену кардіоаскулярними подіями, госпіталізацію через кардіоаскулярну причину, серцеву недостатність, що встановлена вперше, прогресування множинної мієломи, інсульти, що підтверджені під час комп'ютерної томографії.

Статистичний аналіз виконали, застосували програму SPSS для Windows v. 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, США). Залежно від типу розподілу для кожної з безперервних величин визначали або середнє (M) і стандартне відхилення ( $\sigma$ ), або медіану й квартилі. Для порівняння груп пацієнтів за основними показниками (залежно від типу розподілу аналізованих показників), використали безперервний непарний t-критерій Стьюдента або U-критерій Манна-Вітні. Для аналізу таблиць спряженості 2 × 2 застосували двобічний точний критерій Фішера та критерій  $\chi^2$ . Потенційні фактори визначили за допомогою

Таблиця 1. Характеристика пацієнтів, які залучені в дослідження

Показник, одиниці вимірювання	Група без кардіоваскулярних подій (n = 49)	Група з кардіоваскулярними подіями (n = 18)	p
Вік, роки	59,21 (48,16; 68,32)	61,00 (52,12; 69,81)	>0,05
Чоловіки, n (%)	21 (42,9)	9 (50,0)	>0,05
Артеріальна гіпертензія, n (%)	6 (12,3)	4 (22,2)	>0,05
Дисліпідемія, n (%)	27 (55,1)	11 (61,1)	>0,05
Цукровий діабет 2 типу, n (%)	0 (0,0)	1 (5,5)	>0,05
ІМТ, кг/м <sup>2</sup>	26,74 (25,69; 27,79)	27,40 (25,82; 28,98)	>0,05
Ожиріння, n (%)	5 (10,2)	3 (16,7)	>0,05
Надлишкова маса тіла, n (%)	13 (26,5)	5 (27,7)	>0,05
Схильність до тютюнокуріння, n (%)	2 (4,1)	1 (5,6)	>0,05
ШКФ, мл/хв/1,73 м <sup>2</sup>	102,30 (79,40; 127,60)	101,05 (80,80; 142,80)	>0,05
Креатинін, ммоль/л	68,71 (52,41; 86,12)	73,67 (50,25; 90,98)	>0,05
Загальний холестерин, ммоль/л	5,09 (4,28; 5,99)	4,77 (3,89; 6,12)	>0,05
САТ, мм рт. ст.	124,3 (115,6; 138,8)	129,0 (116,3; 142,0)	>0,05
ЧСС, удари за 1 хв	80,56 (70,22; 90,58)	79,43 (68,3; 94,48)	>0,05
ФВ, %	58,11 (51,25; 64,80)	55,84 (51,41; 59,65)	>0,05
Е/А, од.	1,12 (0,74; 1,38)	1,17 (0,98; 1,32)	>0,05
Е', см/с	5,01 (3,82; 6,12)	4,45 (3,34; 5,74)	>0,05
Е/Е', од.	7,14 (5,45; 9,16)	9,29 (7,30; 11,17)	<0,05
ІАПФ або АРАІІ, n (%)	5 (10,2)	5 (27,7)	>0,05
Ацетилсаліцилова кислота, n (%)	41 (83,7)	12 (66,7)	>0,05
Статини, n (%)	27 (55,1)	4 (22,2)	<0,05
Метформін, n (%)	0 (0,0)	1 (5,6)	>0,05
Діуретики, n (%)	3 (6,1)	6 (33,3)	<0,05
Антагоністи альдостерону, n (%)	4 (8,1)	2 (11,1)	>0,05

уніваріантного аналізу (ANOVA), надалі – мультиваріантного регресійного аналізу. Різницю показників вважали статистично значущою, коли  $p < 0,05$ .

Дослідники чітко дотримувались усіх вимог щодо здійснення клінічних досліджень. Усі пацієнти надали письмову інформовану згоду на участь.

## Результати

Середній час спостереження за пацієнтами становив 14,0 (11,4–19,1) місяця. Із 67 пацієнтів, яких залучили в дослідження, у 18 (26,9 %) зареєстрували 36 кардіоваскулярних подій: 2 смерті внаслідок кардіоваскулярного захворювання, 16 аритмій серця, 3 епізоди стенокардії, 1 інсульт, 4 випадки встановлення хронічної серцевої недостатності. Протягом періоду спостереження пацієнти були госпіталізовані 10 разів через виникнення кардіоваскулярної патології. В групі дослідження зафіксували 2 смерті, які не мали зв'язку з серцево-судинними подіями.

Групи пацієнтів не відрізнялися за демографічними характеристиками, факторами ризику виникнення сер-

цево-судинних захворювань, результатами біохімічних тестів, показниками гемодинаміки. Деяко гірші значення показників діастолічної та систолічної функції міокарда виявили в групі хворих на множинну мієлому порівняно з контрольною.

Медіана концентрації sST2 у групі хворих без кардіоваскулярних подій становила 24,17 нг/мл (95 % довірчий інтервал (ДІ) = 12,87–27,48 нг/мл), у групі пацієнтів із кардіоваскулярними подіями – 47,57 нг/мл (95 % ДІ = 21,36–68,79 нг/мл) ( $p = 0,018$ ).

Медіана концентрації Р-селектину в пацієнтів без кардіоваскулярних подій становила 58,24 нг/мл (95 % ДІ = 32,27–77,48 нг/мл), у хворих із кардіоваскулярними подіями – 87,57 нг/мл (95 % ДІ = 51,12–114,89 нг/мл) ( $p < 0,01$ ).

Для визначення здатності біологічних маркерів прогнозувати кардіоваскулярні події у хворих на множинну мієлому здійснили ROC-аналіз. Для кількісного оцінювання значущості тесту застосовували площу під ROC-кривою – AUC (Area Under Curve). Виявили, що sST2 значущо пов'язаний із кардіоваскулярними

подіями. На час залучення в дослідження для sST2 на кривій оптимальною точкою поділу є 31,05 нг/мл (AUC ROC = 0,763 ± 0,045,  $p < 0,01$ , чутливість – 71,5 %, специфічність – 89,8 %). Для P-селектину точкою поділу була концентрація 54,21 нг/мл (AUC ROC = 0,715 ± 0,041,  $p < 0,01$ ; чутливість – 69,6 %, специфічність – 86,2 %).

Для кількісного зіставлення клінічної значущості ROC-кривих біологічних маркерів застосували показник AUC. Грунтуючись на даних, що одержали, зробили висновок: прогностична якість моделі для sST2 дуже висока, для P-селектину – висока.

Аналіз виникнення кардіоваскулярних подій у хворих на множинну мієлому впродовж 12 місяців спостереження залежно від рівня sST2 менше ніж 31,05 нг/мл і понад 31,05 нг/мл на час залучення в дослідження показав статистично значущі розбіжності за кількістю очікуваних подій (log-rank тест:  $\chi^2 = 202,300$ ;  $p < 0,01$ ). Залежно від рівня P-селектину менше ніж 54,21 нг/мл і понад 54,21 нг/мл на час залучення в дослідження також встановлено статистично значущі розбіжності за кількістю очікуваних подій (log-rank тест:  $\chi^2 = 184,800$ ;  $p < 0,01$ ).

Для порівняння результатів ROC-аналізу у хворих на множинну мієлому використали показник AUC, який для P-селектину і sST2 досягав значення понад 0,7. Це дало підстави визначити ці біологічні маркери як пріоритетні для формування прогностичної моделі. В разі застосування двох біомаркерів з'ясували: найбільшу AUC мала комбінація sST2 і P-селектину (AUC ROC = 0,860 ± 0,045,  $p < 0,001$ , чутливість – 74,7 %, специфічність – 91,4 %).

Через залежність рівнів sST2 і P-селектину від анамнестичних, клінічних, кардіогемодинамічних факторів перевірили припущення, що ці фактори можуть впливати на виникнення кардіоваскулярних подій незалежно від рівнів біомаркерів. Для розподілу когорт за допомогою біомаркерів застосували уніваріантний і мультivarіантний регресійні аналізи. Під час уніваріантного регресійного аналізу головними факторами, що незалежно пов'язані з кардіоваскулярними подіями, були sST2, E/E'. Мультivarіантний регресійний аналіз встановив sST2 як незалежний прогностичний маркер кардіоваскулярних подій (відношення шансів (ВШ) = 1,11; 95 % ДІ = 1,08–1,15;  $p = 0,01$ ) впродовж 1 року спостереження. Цукровий діабет 2 типу, ФВ, ожиріння не мали предикторних властивостей. Мультivarіантний регресійний аналіз визначив P-селектин незалежним прогностичним маркером кардіоваскулярних подій (ВШ = 1,08; 95 % ДІ = 1,02–1,14;  $p < 0,05$ ) протягом 1 року спостереження.

Зазначимо, що метод пропорційної інтенсивності за Коксом, який застосували, ґрунтується на припущенні про незалежний вплив факторів від часу впродовж дослідження. Втім, про можливість недооцінки деяких факторів свідчить експотенційний характер розподілу частот кінцевих точок.

## Обговорення

Незважаючи на широке використання міжнародних клінічних протоколів, результати лікування множин-

ної мієломи в межах великих досліджень і в рутинній практиці відрізняються. Фактори, що спричиняють цю різницю, залишаються нез'ясованими. Визначили, що частина пацієнтів із множинною мієломою має високий кардіоваскулярний ризик, пов'язаний із міокардіальним стресом і фіброзом. Тому вважаємо перспективними біологічні маркери кардіального механічного напруження для прогнозу виникнення кардіоваскулярних подій.

У пацієнтів із множинною мієломою підвищення рівня циркулюючого sST2 асоціюється зі збільшенням ризику кардіоваскулярних подій. Виявили також, що прогностична цінність sST2 вища в комбінації з E/E'. Необхідно продовжити пошук нових прогностичних маркерів для покращення стратифікації ризику виникнення кумулятивних кардіоваскулярних подій.

У межах цього дослідження підтвердили прогностичне значення нових біомаркерів для пацієнтів із множинною мієломою. Результати, що одержали у нашій когорті пацієнтів, показали: нові біомаркери sST2 і P-селектин мають істотні прогностичні властивості щодо виникнення кардіоваскулярних подій у хворих на множинну мієлому.

Останнім часом біомаркери тропонін I, високочутливий тропонін I, BNP, NT-proBNP використовують для визначення діагнозу та прогнозування кардіотоксичності протипухлинного лікування [10].

Оскільки порушення міокарда – важливий фактор прогнозу при множинній мієломі, параметри кардіальної функції або патології безпосередньо пов'язані з прогнозом у пацієнтів з множинною мієломою. Чимала частина хворих на множинну мієлому вже мають порушення систолічної та діастолічної функції серця на час встановлення діагнозу [1].

У зв'язку із тим, що виживаність пацієнтів із множинною мієломою істотно збільшилася завдяки впровадженню нових лікарських засобів і трансплантації стовбурових клітин, виникла необхідність детальнішої стратифікації ризику кардіоваскулярних подій при цій патології.

Традиційні біомаркери, незважаючи на їхню прогностичну цінність, що визначена в попередніх дослідженнях, мають певні недоліки. Так, прогностична цінність NT-proBNP сильно залежить від об'єму циркулюючої крові та функції нирок [11]. Тому новітні біомаркери можуть мати переваги, враховуючи обмеження традиційних біомаркерів.

Важливе значення в сигнальному ланцюгу IL-33 має sST2, який належить до сімейства рецепторів IL-1 [12]. Рівень sST2 підвищується в пацієнтів із серцевою недостатністю, що шляхом блокування рецепторів IL-33 зменшує його кардіопротективні ефекти [13]. Багато досліджень вказують на значущий зв'язок між sST2 і прогнозом пацієнтів із гострою та хронічною серцевою недостатністю [14].

Результати нашого дослідження показали: sST2 і P-селектин мають прогностичну цінність у пацієнтів із множинною мієломою. Комбінація sST2 і P-селектину має істотну прогностичну цінність щодо виникнення

кардіоваскулярних подій, перевищує окреме прогностичне значення кожного із цих біомаркерів. Крім того, рівні sST2 і P-селектину пов'язані з показниками діастолічної функції лівого шлуночка (септальна швидкість  $e'$ ). Результати, що одержали, свідчать про можливість застосування sST2 і P-селектину для продовження визначення прогнозу в пацієнтів із множинною мієломою. Стратифікація ризику з новими біомаркерами може допомогти у визначенні групи пацієнтів для застосування нових стратегій лікування.

У дослідженні, що здійснили, є обмеження. Так, залучили відносно невелику кількість пацієнтів, тому оптимальні точки поділу концентрацій sST2 і P-селектину потребують валідації в наступних дослідженнях. Крім того, зазначимо: це когортне дослідження – одного центру, а прогноз і базові характеристики наших пацієнтів можуть не відбивати загальну популяцію хворих на множинну мієлому.

## Висновки

1. Новітні біомаркери sST2 і P-селектин мають прогностичні властивості щодо виникнення кардіоваскулярних подій у пацієнтів із множинною мієломою.

2. Біомаркери sST2 і P-селектин можуть забезпечити додаткову стратифікацію ризику в хворих на множинну мієлому.

3. У пацієнтів із підтвердженою множинною мієломою в повній або частковій ремісії підвищення рівня циркулюючого sST2 асоціюється з виникненням кардіоваскулярних подій протягом 1 року.

4. Наступні дослідження потрібні для валідації оптимальних точок поділу концентрацій sST2 і P-селектину, а також оцінювання можливості їх застосування для моніторингу ефективності лікування.

**Перспективи подальших досліджень.** Необхідні наступні незалежні дослідження із залученням більшої когорти пацієнтів для повної валідації та підтвердження нашої гіпотези про додаткові прогностичні властивості sST2 і P-селектину в хворих на множинну мієлому.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

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

## Відомості про авторів:

Панасенко М. О., очний аспірант каф. внутрішніх хвороб 3, Запорізький державний медичний університет, Україна.  
ORCID ID: [0000-0002-2619-3846](https://orcid.org/0000-0002-2619-3846)

Самура Б. Б., д-р мед. наук, професор каф. внутрішніх хвороб 3, Запорізький державний медичний університет, Україна.  
ORCID ID: [0000-0002-4311-1806](https://orcid.org/0000-0002-4311-1806)

Доценко С. Я., д-р мед. наук, професор, зав. каф. внутрішніх хвороб 3, Запорізький державний медичний університет, Україна.  
ORCID ID: [0000-0002-6584-4154](https://orcid.org/0000-0002-6584-4154)

## Information about authors:

Panasenko M. O., PhD-student of the Department of Internal Diseases 3, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.  
Samura B. B., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Internal Diseases 3, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Dotsenko S. Ya., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Internal Disease 3, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

## Список літератури

- [1] Management of cardiovascular risk in patients with multiple myeloma / C. Plummer, C. Driessen, Z. Szabo, M. V. Mateos. *Blood cancer journal*. 2019. Vol. 9, Iss. 3. P. 26. <https://doi.org/10.1038/s41408-019-0183-y>
- [2] Comparison of Serum and Heparin-Plasma Samples in Different Generations of Dimension Troponin I Assay / R. M. Dorizzi et al. *Clinical Chemistry*. 2002. Vol. 48, Iss. 12. P. 2294-2296. <https://doi.org/10.1093/clinchem/48.12.2294>
- [3] Maries L., Manitiu I. Diagnostic and prognostic values of B-type natriuretic peptides (BNP) and N-terminal fragment brain natriuretic peptides (NT-pro-BNP) : review article. *Cardiovascular Journal of Africa*. 2013. Vol. 24, Iss. 7. P. 286-289. <https://doi.org/10.5830/cvja-2013-055>
- [4] Samura B., Panasenکو M. SST2 as a predictor of statin treatment efficacy in patients with multiple myeloma. *Georgian Medical News*. 2022. Vol. 326. P. 18-22.
- [5] Панасенко М. О., Самура Б. Б., Доценко С. Я. Значення P-селектину в прогнозі кардіоваскулярних подій у пацієнтів із множинною мієломою. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2022. Т. 15, № 2. С. 186-191. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2022.2.259829>
- [6] Mor-Avi V., Lang R. M. Transthoracic Three-Dimensional Echocardiography. *Advanced Echocardiographic Approaches*. 2012. P. 1-20. <https://doi.org/10.1016/b978-1-4377-2697-8.00001-8>
- [7] Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої), третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги «Множинна мієлома» : Наказ МОЗ України від 02.11.2015 № 710. URL : [https://dec.gov.ua/wp-content/uploads/images/dodatki/2015\\_710\\_MM/2015\\_710\\_YKPMO\\_MM.pdf](https://dec.gov.ua/wp-content/uploads/images/dodatki/2015_710_MM/2015_710_YKPMO_MM.pdf)
- [8] 2020 International Society of Hypertension Global Hypertension Practice Guidelines / T. Unger et al. *Hypertension*. 2020. Vol. 75, Iss. 6. P. 1334-1357. <https://doi.org/10.1161/hypertensionaha.120.15026>
- [9] Wright J. J., Tylee T. S. Pharmacologic Therapy of Type 2 Diabetes. *Medical Clinics of North America*. 2016. Vol. 100, Iss. 4. P. 647-663. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2016.03.014>
- [10] 2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines / J. L. Zamorano et al. *European Journal of Heart Failure*. 2016. Vol. 19, Iss. 1. P. 9-42. <https://doi.org/10.1002/ejhf.654>
- [11] Serum Cardiac Troponins and N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide: A Staging System for Primary Systemic Amyloidosis / A. Dispenzieri et al. *Journal of Clinical Oncology*. 2004. Vol. 22, Iss. 18. P. 3751-3757. <https://doi.org/10.1200/jco.2004.03.029>
- [12] Interleukin-33 Prevents Apoptosis and Improves Survival After Experimental Myocardial Infarction Through ST2 Signaling / K. Seki et al. *Circulation: Heart Failure*. 2009. Vol. 2, Iss. 6. P. 684-691. <https://doi.org/10.1161/circheartfailure.109.873240>
- [13] IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system / S. Sanada et al. *Journal of Clinical Investigation*. 2007. Vol. 117, Iss. 6. P. 1538-1549. <https://doi.org/10.1172/jci30634>
- [14] Increased soluble ST2 is a stronger predictor of long-term cardiovascular death than natriuretic peptides in heart failure patients with reduced ejection fraction / D. Gruson, T. Lepoutre, S. A. Ahn, M. F. Rousseau. *International Journal of Cardiology*. 2014. Vol. 172, Iss. 1. P. e250-e252. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.12.101>

## References

- [1] Plummer, C., Driessen, C., Szabo, Z., & Mateos, M.-V. (2019). Management of cardiovascular risk in patients with multiple myeloma. *Blood Cancer Journal*, 9(3). <https://doi.org/10.1038/s41408-019-0183-y>
- [2] Dorizzi, R. M., Caputo, M., Ferrari, A., Lipa, L., & Rizzotti, P. (2002). Comparison of Serum and Heparin-Plasma Samples in Different Generations of Dimension Troponin I Assay. *Clinical Chemistry*, 48(12), 2294-2296. <https://doi.org/10.1093/clinchem/48.12.2294>
- [3] Maries, L., & Manitiu, I. (2013). Diagnostic and prognostic values of B-type natriuretic peptides (BNP) and N-terminal fragment brain natriuretic peptides (NT-pro-BNP) : review article. *Cardiovascular Journal of Africa*, 24(7), 286-289. <https://doi.org/10.5830/cvja-2013-055>

- [4] Samura, B., & Panasenکو, M. (2022). SST2 as a predictor of statin treatment efficacy in patients with multiple myeloma. *Georgian Medical News*, 326, 18-22.
- [5] Panasenکو, M. O., Samura, B. B., & Dotsenko, S. Ya. (2022). Znachennia R-selektynu v prohnozi kardiovaskuliarnykh podii u patsientiv iz mnozhynnoiui mielomoiu [Value of P-selectin in the prognosis of cardiovascular events in patients with multiple myeloma]. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*, 15(2), 186-189. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2022.2.259829>
- [6] Mor-Avi, V., & Lang, R. M. (2011). Transthoracic Three-Dimensional Echocardiography. In *Advanced Approaches in Echocardiography* (pp. 1-20). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-2697-8.00001-8>
- [7] Ministry of Health of Ukraine. (2015, November 2). *Unifikovanyi klinichnyi protokol pervynnoi, vtorynnoi (spetsializovanoi), tretynnoi (vysokospetsializovanoi) medychnoi dopomohy "Mnozhynna mieloma"* [Unified clinical protocol of primary, secondary (specialized), tertiary (highly specialized) medical care «Multiple myeloma» (No. 710)]. [in Ukrainian]. [https://dec.gov.ua/wp-content/uploads/images/dodatki/2015\\_710\\_MM/2015\\_710\\_YKPMDD\\_MM.pdf](https://dec.gov.ua/wp-content/uploads/images/dodatki/2015_710_MM/2015_710_YKPMDD_MM.pdf)
- [8] Unger, T., Borghi, C., Charchar, F., Khan, N. A., Poulter, N. R., Prabhakaran, D., Ramirez, A., Schlaich, M., Stergiou, G. S., Tomaszewski, M., Wainford, R. D., Williams, B., & Schutte, A. E. (2020). 2020 International Society of Hypertension Global Hypertension Practice Guidelines. *Hypertension*, 75(6), 1334-1357. <https://doi.org/10.1161/hypertensionaha.120.15026>
- [9] Wright, J. J., & Tylee, T. S. (2016). Pharmacologic Therapy of Type 2 Diabetes. *Medical Clinics of North America*, 100(4), 647-663. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2016.03.014>
- [10] Zamorano, J. L., Lancellotti, P., Rodriguez Muñoz, D., Aboyans, V., Asteggiano, R., Galderisi, M., Habib, G., Lenihan, D. J., Lip, G., Lyon, A. R., Lopez Fernandez, T., Mohty, D., Piepoli, M. F., Tamargo, J., Torbicki, A., Suter, T. M., & ESC Scientific Document Group (2016). 2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines: The Task Force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal*, 37(36), 2768-2801. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw211>
- [11] Dispenzieri, A., Gertz, M. A., Kyle, R. A., Lacy, M. Q., Burritt, M. F., Therneau, T. M., Greipp, P. R., Witzig, T. E., Lust, J. A., Rajkumar, S. V., Fonseca, R., Zeldenrust, S. R., McGregor, C. G. A., & Jaffe, A. S. (2004). Serum Cardiac Troponins and N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide: A Staging System for Primary Systemic Amyloidosis. *Journal of Clinical Oncology*, 22(18), 3751-3757. <https://doi.org/10.1200/jco.2004.03.029>
- [12] Seki, K., Sanada, S., Kudinova, A. Y., Steinhauser, M. L., Handa, V., Gannon, J., & Lee, R. T. (2009). Interleukin-33 Prevents Apoptosis and Improves Survival After Experimental Myocardial Infarction Through ST2 Signaling. *Circulation: Heart Failure*, 2(6), 684-691. <https://doi.org/10.1161/circheartfailure.109.873240>
- [13] Sanada, S., Hakuno, D., Higgins, L. J., Schreiter, E. R., McKenzie, A. N. J., & Lee, R. T. (2007). IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *Journal of Clinical Investigation*, 117(6), 1538-1549. <https://doi.org/10.1172/jci30634>
- [14] Gruson, D., Lepoutre, T., Ahn, S. A., & Rousseau, M. F. (2014). Increased soluble ST2 is a stronger predictor of long-term cardiovascular death than natriuretic peptides in heart failure patients with reduced ejection fraction. *International Journal of Cardiology*, 172(1), e250-e252. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.12.101>



# Стан ниркової функції у чоловіків із гіпертонічною хворобою в умовах порушень пуринового та вуглеводного обміну

М. Ю. Колесник<sup>ID</sup><sup>A,E,F</sup>, О. В. Дудко<sup>ID</sup><sup>\*A,B,C,D,E,F</sup>

Запорізький державний медичний 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

**Мета роботи** – оцінити стан ниркової функції в чоловіків із гіпертонічною хворобою в умовах порушення пуринового та вуглеводного обміну.

**Матеріали і методи.** У 60 пацієнтів чоловічої статі (вік – 18–65 років) із гіпертонічною хворобою I–II стадій, порушеннями пуринового та вуглеводного обміну визначали рівень сечової кислоти (СК) добової сечі, фракційної екскреції СК, креатиніну добової сечі, мікроальбуміну в сечі та рівень цистатину С. Для дослідження гемодинаміки виконали добове моніторування артеріального тиску (АТ). Оцінювання показників кінетики та деформації міокарда – в режимі offline за допомогою інтегрованого до ультразвукового приладу пакету програм Xstrain (Esaote, Італія). Пацієнтів поділили на 2 клінічні групи: 1 – гіпертонічна хвороба (ГХ) із гіперурикемією; 2 – ГХ без урикемії. Статистичний аналіз результатів виконали, використавши пакет програм Statistica 13.0 (Statsoft, США).

**Результати.** У хворих 1 групи встановили достовірно вищий рівень мікроальбуміну сечі та вірогідне зниження показника фракційної екскреції СК ( $p < 0,001$ ) порівняно з пацієнтами 2 групи. Це вказує на погіршення ниркової функції в умовах гіперурикемії.

У 1 групі виявили позитивний кореляційний зв'язок цистатину С із середнім денним систолічним АТ (САТ) ( $r = 0,408$ ) і варіабельністю діастолічного АТ (ДАТ) уночі ( $r = 0,405$ ), мікроальбуміну сечі з середнім САТ уночі ( $r = 0,390$ ) та середнім пульсовим АТ ( $r = 0,402$ ), товщиною задньої стінки лівого шлуночка (ЛШ) ( $r = 0,438$ ), індексом маси міокарда ЛШ ( $r = 0,621$ ), кінцево-діастолічним індексом (КДІ) ( $r = 0,492$ ), кінцево-систолічним індексом (КСІ) ( $r = 0,426$ ), передньо-заднім розміром ЛШ ( $r = 0,385$ ). Негативний кореляційний зв'язок визначили між СК сироватки крові та фракцією викиду ЛШ ( $r = -0,410$ ), мікроальбуміну сечі та серцевим індексом ( $r = -0,555$ ), швидкістю руху латеральної частини фіброзного кільця мітрального клапана ( $r = -0,453$ ).

**Висновки.** У результаті дослідження встановили негативний вплив гіперурикемії та гіперглікемії на ниркову функцію в пацієнтів із ГХ. Про ці зміни свідчить збільшення мікроальбумінурії, зниження фракційної екскреції СК і підвищення рівня СК сироватки, ремоделювання міокарда та погіршення систолічної функції серця, погіршення добового профілю АТ.

**Ключові слова:** гіпертонічна хвороба, ниркова функція, гіперурикемія, гіперглікемія, мікроальбумінурія.

**Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2022. Т. 15, № 3(40). С. 313–318**

## The renal function in men with hypertension in conditions of purine and carbohydrate metabolism disorders

M. Yu. Kolesnyk, O. V. Dudko

**Aim.** To assess the condition of renal function in hypertensive men in conditions of disorders of purine and carbohydrate metabolism

**Material and methods.** 60 male patients (aged from 18 to 65 years) with stage I–II of arterial hypertension (AH) and purine and carbohydrate metabolism disorders were examined. In these patients, the level of uric acid (UA) in daily urine, fractional excretion of UA, creatinine in daily urine, microalbumin in urine and the cystatin C level were determined. Hemodynamics was studied by daily blood pressure monitoring. Assessment of kinetics and deformation of the myocardium in offline mode using the Xstrain software package integrated into the ultrasound device (Esaote, Italy) was made. Patients were divided into 2 clinical groups – 1 group of AH with hyperuricemia, 2 – AH without uricemia. Statistical analysis of the results was performed using the Statistica 13.0 software package (Statsoft, USA).

**Results.** Correlation analysis in group 1 showed a positive correlation of cystatin C with the average daytime systolic blood pressure (SBP) ( $r = 0.408$ ) and the variability of diastolic blood pressure (DBP) at night ( $r = 0.405$ ), urinary microalbumin with the average SBP at night ( $r = 0.390$ ) and average pulse blood pressure ( $r = 0.402$ ), LV posterior wall thickness ( $r = 0.438$ ), LV myocardial mass index ( $r = 0.621$ ), end-diastolic index (EDI) ( $r = 0.492$ ), end-systolic index (ESI) ( $r = 0.426$ ), LV anterior-posterior size ( $r = 0.385$ ). A negative correlation was established between blood serum SC and ejection fraction (EF) of the LV ( $r = -0.410$ ), urinary microalbumin with cardiac index (SI) ( $r = -0.555$ ) and the speed of movement of the lateral (e' lat) part of the annulus fibrosus mitral valve ( $r = -0.453$ ).

### ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/266580>

UDC 616.61-06:616.12-008.331]-06:616-008:[577.123.3+577.124]-055.1

DOI: [10.14739/2409-2932.2022.3.266580](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2022.3.266580)

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 313–318

**Key words:** arterial hypertension, kidney function, hyperuricemia, hyperglycemia, microalbuminuria.

\*E-mail: [odudko.doc@gmail.com](mailto:odudko.doc@gmail.com)

Received: 08.06.2022 // Revised: 27.06.2022 // Accepted: 05.08.2022

**Conclusions.** As a result of the studies, the negative influence of hyperuricemia and hyperglycemia in patients with AH on renal function was established. These changes were evidenced by an increase in microalbuminuria level, a decrease in the fractional excretion of UA, an increasing the serum UA level, remodeling of the myocardium, and worsening of the heart systolic function, worsening of the daily blood pressure profile.

**Key words:** arterial hypertension, kidney function, hyperuricemia, hyperglycemia, microalbuminuria.

**Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 313–318**

Гіпертонічна хвороба (ГХ) – найпоширеніше захворювання серед хвороб системи кровообігу. За даними ВООЗ, у світі 1,28 млрд дорослих людей віком 30–79 років страждають на ГХ, майже 46 % не знають про своє захворювання, а менше ніж 42 % випадків діагностують і лікують [1]. В Україні частка ГХ у структурі серцево-судинних захворювань становить 41,2 % [2]. У світі поширеність ГХ серед чоловіків вища (41,4 %), ніж серед жінок (37,7 %) [3]. Ризик розвитку серцево-судинних подій, пов'язаних із ГХ, визначається не тільки рівнем артеріального тиску (АТ) та кількістю чинників ризику, але й наявністю пошкодження органів-мішеней [4].

За даними міжнародних товариств ESC/ESH (2018), KDIGO (2012), ACC/AHA (2019) [5–7], ГХ – важливий фактор виникнення хронічної хвороби нирок (ХХН); її поширеність становить 60–90 % залежно від стадії ХХН та її причини [8]. В останні роки багато уваги приділяють гіперурикемії як незалежному додатковому фактору кардіоваскулярного ризику та погіршенню ниркової функції з формуванням ХХН. Експериментальні дослідження показали: підвищення рівня сечової кислоти (СК) призводить до розвитку ГХ внаслідок прямого негативного впливу СК на гладкі м'язи (стимулює проліферацію гладком'язових клітин судин шляхом активації ростових факторів, вазоконстрикторних і прозапальних молекул) і на ендотелій судин (пригнічує синтез оксиду азоту (NO), стимулює оксидативний стрес) [9,10,16]. Це призводить до розвитку прегломерулярної артеріопатії та тубулоінтерстиційного ураження, активації ренін-ангіотензинової системи.

СК може викликати погіршення чутливості тканин до інсуліну, призводячи до інсулінорезистентності та підвищення рівня глюкози крові [11,12]. Механізми нефротоксичної дії гіперглікемії пов'язані з неферментативним глікуванням білків і ліпідів ниркових мембран, що змінюють їхню структуру та функцію; з прямим токсичним впливом глюкози на тканину нирок, що спричиняє активацію ферменту протеїнази С і підвищення проникності ниркових судин; з активацією окисних реакцій, що стимулюють утворення великої кількості вільних радикалів, які мають цитотоксичний ефект [13].

Основні маркери ураження нирок – рівні протеїнурії, альбумінурії, концентрація креатиніну крові, екскреція креатиніну з сечею, швидкість клубочкової фільтрації (ШКФ). У разі порушення пуринового обміну додатковими маркерами, що вказують на погіршення ниркової функції та екскреції сечової кислоти, є визначення СК у добовій сечі та фракційна екскреція СК. Урати крові добре фільтруються гломерулярним апаратом і здебільшого

реабсорбуються в проксимальних відділах клубочків. Тільки 3–10 % відфільтрованих уратів екскретуються з сечею, решта реабсорбується в проксимальних відділах ниркових канальців. Фракційна екскреція СК дає змогу визначати ефективність реабсорбції уратів нирками [14].

Порушення пуринового обміну запускає каскад патологічних реакцій, котрі призводять до погіршення функціонування всіх органів і систем, асоціюються з кластерами метаболічного синдрому [11]. У світі 25–35 % дорослого населення мають метаболічні зміни, наслідком яких є розвиток інсулінорезистентності, дисліпідемії, вісцерального ожиріння, артеріальної гіпертензії, гіперкоагуляційного стану, ендотеліальної дисфункції, гіперурикемії [15]. Порушення функції нирок на тлі ГХ, особливо в умовах метаболічних змін, свідчить про вірогідне підвищення ризику виникнення серцево-судинних ускладнень і кардіальної смерті.

## Мета роботи

Оцінити стан ниркової функції в чоловіків із гіпертонічною хворобою в умовах порушення пуринового та вуглеводного обміну.

## Матеріали і методи дослідження

У відкрите проспективне дослідження залучили 60 чоловіків віком 18–65 років із гіпертонічною хворобою I–II стадій за критеріями Європейського товариства кардіологів (ESC/ESH) 2018 року; в пацієнтів виявили супутні порушення пуринового та вуглеводного обміну [5].

Критерії залучення – чоловіча стать, рівень СК сироватки крові понад 420 мкмоль/л і наявність переддіабету. Критерії виключення передбачали ГХ III стадії, вторинні гіпертензії, гіпертензію «білого халата», ішемічну хворобу серця, фібриляцію або тріпотіння передсердь, вроджені та набуті вади серця, кардіоміопатії, легенеvu гіпертензію, серцеву недостатність, цукровий діабет, онкопатологію (включаючи захворювання крові), хронічну хворобу нирок (ШКФ за СКD-EPI <60 мл/хв), гломерулярні захворювання нирок, активні інфекційні хвороби, загострення хронічного подагричного артрити або гостру подагричну атаку, псоріаз, ожиріння III ступеня, приймання тiazидних і тiazидоподібних діуретиків.

Переддіабет (порушення глікемії натщесерце та/або порушення толерантності до вуглеводів), за рекомендаціями Американської діабетичної асоціації, визначали, коли рівень глюкози в плазмі крові натще становив 5,6–6,9 ммоль/л та/або глікозильованого гемоглобіну – 5,7–6,4 %, а також за результатами глюкозотолерантного тесту [17].



Таблиця 1. Клінічна характеристика пацієнтів із груп дослідження

Показник, одиниці вимірювання	Основна група, n = 31	Контрольна група, n = 29	p
Вік, роки	50,0 (20,0; 61,0)	46,0 (25,0; 62,0)	0,620
Зріст, см	178,0 (163,0; 207,0)	179,0 (168,0; 187,0)	0,662
Вага, кг	94,0 (63,0; 133,0)	97,0 (72,0; 125,0)	0,073
ІМТ, кг/м <sup>2</sup>	28,1 (21,7; 36,2)	31,2 (23,8; 38,0)	0,029
Обвід талії, см	101,0 (86,0; 123,0)	105,0 (94,5; 126,0)	0,016
ГХ, роки	5,0 (1,0; 25,0)	5,0 (0,5; 25,0)	0,994
Ступінь ГХ, n/%:			
1	0	1/3,5	>0,05
2	9/29	11/37,9	
3	22/71	17/58,6	

ГХ: гіпертонічна хвороба; ГУ: гіперурикемія; ІМТ: індекс маси тіла; p: критерій Манна-Вітні.

Усім пацієнтам здійснили дослідження сироватки крові на автоматичному біохімічному аналізаторі Accent-200 (Cormay, Польща) з визначенням рівня СК, креатиніну, цистатину С, глюкози, глікозильованого гемоглобіну. ШКФ розраховували за рівнем креатиніну та цистатину С за формулами Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI). Концентрацію мікроальбуміну сечі виміряли на імунохемілюмінесцентному автоматичному аналізаторі Immulite 100 (Siemens Healthcare, Німеччина). Рівень СК добової сечі, фракційної екскреції СК і креатиніну добової сечі визначали за стандартними розрахунковими формулами. Глюкозотолерантний тест виконали з визначенням рівня глюкози у венозній крові натщесерце та через 2 години після перорального вживання 75 г глюкози.

Для добового моніторингу артеріального тиску (ДМАТ) використали портативний пристрій АВРМ-04 (Meditech, Угорщина). Трансторакальну ехокардіоскопію (ЕХОКС) виконали на ультразвуковому сканері Vivid E9 XDClear Console 4D Expert 100 (General Electric, США), застосувавши фазований датчик M5S-D (1,7–4,6 МГц).

Статистичний аналіз результатів виконали, використовуючи пакет програм Statistica 13.0 (Statsoft, США). Для перевірки нормальності розподілу даних застосували критерій Шапіро-Вілка. Більшість показників мали розподіл, що відрізнявся від нормального, тому дані наведено як медіану та міжквартильний розмах – Me (Q25; Q75). Якісні показники наведено як абсолютні частоти та відсотки (n%). Порівняння між двома незалежними групами здійснили за допомогою непараметричного критерію Манна-Вітні. Для встановлення зв'язку між показниками розраховували коефіцієнт кореляції Спірмена. Статистично значущими вважали відмінності при  $p < 0,05$ .

## Результати

Учасників дослідження поділили на дві групи: перша (основна) – 31 чоловік із ГХ, переддіабетом і супутніми порушеннями пуринового обміну; друга (контрольна) –

29 чоловіків із ГХ і порушеннями метаболізму глюкози без гіперурикемії. Клінічну характеристику пацієнтів наведено в таблиці 1.

Отже, групи дослідження зіставні за віком, зростом, вагою, тривалістю перебігу ГХ і ступенем підвищення артеріального тиску ( $p > 0,05$ ); виявили різницю за ІМТ та обводом талії ( $p < 0,05$ ).

Пацієнти основної групи мали більш виражені порушення ниркової функції порівняно з хворими 2 групи. Результати лабораторних досліджень наведено в таблиці 2.

У хворих 1 групи, які мали артеріальну гіпертензію, гіперглікемію, гіперурикемію, визначили достовірно вищий рівень мікроальбуміну сечі порівняно з пацієнтами 2 групи. У пацієнтів 1 групи виявили також вірогідне зниження показника фракційної екскреції СК ( $p < 0,001$ ), що вказує на погіршення ниркової функції в умовах гіперурикемії. Це зумовлює підвищення рівня СК і спричиняє її негативний вплив на серцево-судинну систему та нирки.

В останні роки як надійніший ендогенний маркер функції нирок використовують цистатин С, особливо для діагностики початкових змін ШКФ [19]. Втім, під час аналізу результатів, що одержали в нашому дослідженні, не виявили достовірної різниці за показником цистатину С у групах дослідження ( $p > 0,05$ ).

Під час кореляційного аналізу встановили вплив параметрів ниркової функції на ДМАТ і структурно-функціональні показники міокарда (за даними трансторакальної ЕХОКС) у групі пацієнтів із ГХ в умовах переддіабету та гіперурикемії. Позитивний кореляційний взаємозв'язок виявили для цистатину С та середнього денного систолічного АТ (САТ) ( $r = +0,408$ ,  $p < 0,05$ ), варіабельності діастолічного АТ (ДАТ) уночі ( $r = +0,405$ ,  $p < 0,05$ ), для мікроальбуміну сечі та середнього САТ уночі ( $r = +0,390$ ,  $p < 0,05$ ), середнього пульсового АТ ( $r = +0,402$ ,  $p < 0,05$ ), товщини задньої стінки ЛШ ( $r = +0,438$ ,  $p < 0,05$ ), індексу маси міокарда ЛШ ( $r = +0,621$ ,  $p < 0,05$ ), кінцево-діастолічного індексу (КДІ) ( $r = +0,492$ ,  $p < 0,05$ ), кінцево-систолічного індексу (КСІ) ( $r = +0,426$ ,  $p < 0,05$ ),

Таблиця 2. Показники ниркової функції в пацієнтів із груп дослідження

Показник	Група 1 (ГХ + ГУ), n = 31	Група 2 (ГХ без ГУ), n = 29	p
СК сироватки	432,0 (276,0; 628,0)	324,0 (186,0; 422,0)	<0,001
Креатинін сироватки	81,0 (57,0; 95,0)	78,0 (62,0; 100,0)	0,473
Цистатин С сироватки	0,87 (0,62; 1,44)	0,93 (0,61; 1,14)	0,087
ШКФ креатинін (СКД-EPI)	100,0 (79,0; 120,0)	98,0 (75,0; 116,0)	0,842
ШКФ цистатин С (СКД-EPI)	99,0 (52,0; 125,0)	91,0 (66,0; 129,0)	0,124
СК добової сечі	4,49 (1,53; 9,12)	5,34 (1,55; 8,82)	0,554
Креатинін добової сечі	11,20 (5,74; 21,70)	12,80 (3,72; 23,40)	0,988
Фракційна екскреція СК	7,10 (4,00; 11,81)	10,30 (7,29; 21,20)	<0,001
Мікроальбумін сечі	11,2 (2,50; 59,50)	9,7 (3,3; 22,2)	<0,001

СК: сечова кислота; ШКФ: швидкість клубочкової фільтрації; p: критерій Манна-Вітні.

передньо-заднього розміру ЛШ ( $r = +0,385$ ,  $p < 0,05$ ). Негативний кореляційний взаємозв'язок встановили між СК сироватки крові та фракцією викиду (ФВ) ЛШ ( $r = -0,410$ ,  $p < 0,05$ ), рівнем мікроальбуміну сечі та серцевим індексом (СІ) ( $r = -0,555$ ,  $p < 0,05$ ), швидкістю руху латеральної ( $e'$  lat) частини фіброзного кільця мітрального клапана ( $r = -0,453$ ,  $p < 0,05$ ).

## Обговорення

Підвищений артеріальний тиск пов'язаний із прискореним темпом погіршення ниркової функції та виникненням ХХН. Гіперурикемія та гіперглікемія прискорюють прогресування ХХН [20]. Дослідження, що здійснили, підтвердили відомі дані про вплив метаболічних порушень (гіперурикемії та гіперглікемії) на функцію нирок у пацієнтів із ГХ [13,21].

Мікроальбумін – ранній маркер ураження нирок (часто ще до зниження ШКФ), має важливе діагностичне та прогностичне значення щодо прогресування ХХН. Появу цього білка вважають показником раннього пошкодження (дисфункції) ендотелію судин (включаючи судини клубочка), що призводить до підвищення проникності судинної стінки та клубочкової фільтрації. Гіперперфузію та гіперфільтрацію частіше реєструють, коли є ожиріння, гіперурикемія та гіперглікемія [18]. В групі пацієнтів із ГХ і метаболічними порушеннями ми визначили вираженішу мікроальбумінурію та зменшення показника фракційної екскреції СК, ніж у групі пацієнтів із ГХ без додаткових факторів ризику. Це збігається з даними інших авторів [14,22]. Отже, підтвердили негативний вплив СК і гіперглікемії на ендотелій судин із порушенням клубочкової фільтрації та реабсорбції. Підвищення екскреції альбуміну з сечею асоціюється з істотним підвищенням кардіоваскулярного ризику. Зниження фракційної екскреції СК і підвищення її реабсорбції спричиняє підвищення рівня урикемії та посилення її негативного впливу на серцево-судинну систему та нирки.

Доведено роль дисфункції нирок у погіршенні структурно-функціональних показників серця з підвищенням ризику виникнення серцево-судинних подій. У нашому

дослідженні виявили позитивний кореляційний зв'язок мікроальбуміну сечі з товщиною задньої стінки ЛШ, індексом маси міокарда ЛШ, негативний – СК сироватки крові та ФВ, мікроальбуміну сечі та серцевого індексу; ці дані підтверджено в інших дослідженнях [23]. Це свідчить про ремоделювання міокарда та погіршення систолічної функції серця при ХХН, особливо коли виявлено гіперурикемію та гіперглікемію.

У результаті дослідження доведено: ураження органів-мішеней при ГХ чітко корелює з середньодобовими величинами, варіабельністю та порушенням добового ритму АТ [24]. Під час ДМАТ у групі пацієнтів із гіперглікемією та гіперурикемією визначили позитивний кореляційний зв'язок цистатину С із середнім денним систолічним АТ, варіабельністю ДАТ уночі, мікроальбуміну сечі з середнім САТ уночі та середнім пульсовим АТ.

## Висновки

1. У чоловіків із гіпертонічною хворобою та супутніми порушеннями пуринового та вуглеводного обміну виявили достовірне збільшення мікроальбумінурії, зниження фракційної екскреції СК і підвищення рівня СК сироватки.

2. Контроль рівня сечової кислоти та глікемії у хворих на ГХ для ранньої діагностики порушення ниркової функції потенційно може запобігти виникненню та прогресуванню ХХН, знизити ризик розвитку серцево-судинних ускладнень і кардіоваскулярних подій.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

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

## Information about authors:

Kolesnyk M. Yu., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Family Medicine, Therapy, Cardiology and Neurology of Faculty of Postgraduate Education, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0001-7566-1899](https://orcid.org/0000-0001-7566-1899)

Dudko O. V., PhD Student of the Department of Family Medicine, Therapy, Cardiology and Neurology, Faculty of Postgraduate Education, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0002-0367-6300](https://orcid.org/0000-0002-0367-6300)

## Відомості про авторів:

Колесник М. Ю., д-р мед. наук, професор каф. сімейної медицини, терапії, кардіології та неврології факультету післядипломної освіти, Запорізький державний медичний університет, Україна.  
Дудко О. В., аспірантка каф. сімейної медицини, терапії, кардіології і неврології ФПО, Запорізький державний медичний університет, Україна.

## Список літератури

- [1] World Health Organization. URL : <https://www.who.int/ru>
- [2] Захворюваність, поширеність та інвалідність унаслідок гіпертонічної хвороби: підходи до аналізу й прогнозування / І. В. Дроздова, А. А. Бабець, Л. Г. Степанова, Л. В. Омельницька. *Український кардіологічний журнал*. 2017. № 1. С. 85-93.
- [3] Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19·1 million participants / NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). *Lancet*. 2017. Vol. 389, Iss. 10064. P. 37-55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31919-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31919-5)
- [4] Стратифікація факторів серцево-судинного ризику і функціональний почечний резерв у больових с есенціальній артеріальної гіпертензією / Л. В. Химіон, Л. С. Тимошук, М. А. Рыбіцкая, А. Б. Шадрин. *Семейная медицина*. 2018. №1. С. 77-80. <https://doi.org/10.30841/2307-5112.1.2018.135226>
- [5] 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH) / B. Williams et al. *European Heart Journal*. Vol. 39, Iss. 33. P. 3021-3104. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy339>
- [6] Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease / A. Levin et al. *Kidney International Supplements*. 2013. Vol. 3, Iss. 1. P. 1-150. <https://doi.org/10.1038/kisup.2012.733>
- [7] 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines / D. K. Arnett et al. *Circulation*. 2019. Vol. 140, Iss. 11. P. 177-232. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000678>
- [8] Hypertension in CKD: Core Curriculum 2019 / E. Ku, B. J. Lee, J. Wei, M. R. Weir. *American journal of kidney diseases*. 2019. Vol 74, Iss. 1. P. 120-131. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2018.12.044>
- [9] Kuwabara M., Kanbay M., Hisatome I. Uric Acid and Hypertension Because of Arterial Stiffness. *Hypertension*. 2018. Vol. 72, Iss. 3. P. 582-584. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11496>
- [10] Берзінь О. В., Кондратюк В. Є. Кардіоваскулярні захворювання при подагрі. *Український науково-молодіжний журнал*. 2018. Т. 108, № 3-4. С. 66-70.
- [11] Головач І. Ю. Безсимптомна гіперурикемія: чи не проходимо ми повз проблему? *Семейная медицина*. 2020. Т. 244, № 8. С. 21-27.
- [12] Bidirectional Association between Diabetes and Gout: the Singapore Chinese Health Study / A. Pan, G. G. Teng, J. M. Yuan, W. P. Koh. *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6. P. 1-8. <https://doi.org/10.1038/srep25766>
- [13] Головач І. Ю. Диабетическая болезнь почек: возможности и значение гликемического контроля для ренопротекции. *Практикующий лікар*. 2016. Т. 16, № 5. С. 17-22.
- [14] Орлова І. В., Станіславчук М. А. Порушення пуринового обміну у хворих на подагру: зв'язок з дисадипокінемією. *ScienceRise: Medical Science*. 2018. Т. 23, № 3. С. 18-22. <https://doi.org/10.15587/2519-4798.2018.127004>
- [15] Корильчук Н. І. Спосіб життя як основа метаболічного синдрому: погляд на наші реалії. *Вісник соціальної гігієни та організації охорони здоров'я України*. 2019. № 3. С. 114-123. <https://doi.org/10.11603/1681-2786.2019.3.10586>
- [16] 2018 updated European League Against Rheumatism evidence-based recommendations for the diagnosis of gout / P. Richette et al. *Annals of the rheumatic diseases*. 2020. Vol. 79, Iss. 1. P. 31-38. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-215315>
- [17] Introduction: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. Diabetes care. 2020. Vol. 43, Suppl. 1. S1-S2. <https://doi.org/10.2337/dc20-Sint>
- [18] Why albuminuria should be assessed more frequently in everyday clinical practice? A position statement / P. Dobrowolski et al. *Polish archives of internal medicine*. 2021. Vol. 131, Iss. 4. P. 393-406. <https://doi.org/10.20452/pamw.15874>
- [19] Черняева А. О., Микитюк М. Р. Цистатин С як маркер ниркової функції у хворих на цукровий діабет з порушеннями пуринового обміну. *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії*. 2021. Т. 21, № 2. С. 87-92. <https://doi.org/10.31718/2077-1096.21.2.87>
- [20] Zhang X., Lerman L. O. The Metabolic Syndrome and Chronic Kidney Disease. *Translational Research*. 2017. Mosby Inc. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.12.004>
- [21] Serum uric acid and arterial hypertension – Data from Sephar III survey / R. Buzas et al. *PLoS One*. 2018. Vol. 13, Iss. 7. P. 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199865>
- [22] Association of systolic blood pressure and pulse pressure with microalbuminuria in treatment-naïve hypertensive patients / N. Xie et al. *Archives of medical science : AMS*. 2019. Vol. 15, Iss. 4. P. 832-836. <https://doi.org/10.5114/aoms.2018.77727>
- [23] Coronary Microvascular Dysfunction, Left Ventricular Remodeling, and Clinical Outcomes in Patients With Chronic Kidney Impairment / N. S. Bajaj et al. *Circulation*. 2020. Vol. 141, Iss. 1. P. 21-33. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.043916>
- [24] Химіон Л. В., Тимошук Л. С. Вплив варіабельності артеріального тиску на функціональний нирковий резерв при есенціальній артеріальній гіпертензії І стадії. *Семейная медицина*. 2017. № 1. С. 72-79.

## References

- [1] World Health Organization. <https://www.who.int/ru>
- [2] Drozdova I. V., Babets A. A., Stepanova L. H., Omelnytska L. V. (2017). Zakhvoriuvanist, poshyrenist ta invalidnist unaslidok hipertonichnoyi khvoroby: pidkhody do analizu y prognuzovannia [Incidence, prevalence and disability due to hypertension: approaches to analysis and forecasting]. *Ukrainskyi kardiologichnyi zhurnal*, (1), 85-93. [in Ukrainian].
- [3] NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC) (2017). Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19·1 million participants. *Lancet*, 389(10064), 37-55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31919-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31919-5)
- [4] Khimion, L. V., Tymoshchuk, L. S., Rybitskaia, M. A., & Shadrin, A. B. (2018). Stratifikatsiya faktorov serdechno-sosudistogo rizika i funktsionalnyi pochechnyi rezerv u bolnykh s esentsial'noi arterialnoi gipertenziie [Stratification of cardiovascular risk factors and functional renal reserve in patients with essential arterial hypertension]. *Semeinaia meditsyna*, (1), 77-80. [in Russian]. <https://doi.org/10.30841/2307-5112.1.2018.135226>
- [5] Williams, B., Mancia, G., Spiering, W., Agabiti Rosei, E., Azizi, M., Burnier, M., Clement, D. L., Coca, A., de Simone, G., Dominiczak, A., Kahan, T., Mahfoud, F., Redon, J., Ruilope, L., Zanchetti, A., Kerins, M., Kjeldsen, S. E., Kreutz, R., Laurent, S., Lip, G., ... Authors/Task Force Members: (2018). 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH). *European Heart Journal*, 39(33), 3021-3104. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy339>
- [6] Levin, A., Stevens, P. E., Bilous, R. W., Coresh, J., De Francisco, A. L. M., De Jong, P. E., Griffith, K., Hemmelgarn, B., Iseki, K., Lamb, E., Levey, A., Riella, M., Shlipak, M., Wang, H., White, C., ... Winearls, C. G. (2013). Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney International Supplements*, 3(1), 1-150. <https://doi.org/10.1038/kisup.2012.733>
- [7] Arnett, D. K., Blumenthal, R. S., Albert, M. A., Buroker, A. B., Goldberg, Z. D., Hahn, E. J., Himmelfarb, C. D., Khera, A., Lloyd-Jones, D., McEvoy, J. W., Michos, E. D., Miedema, M. D., Muñoz, D., Smith, S. C., Jr, Virani, S. S., Williams, K. A., Sr, Yeboah, J., & Ziaieian, B. (2019). 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*, 140(11), e596-e646. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000678>
- [8] Ku, E., Lee, B. J., Wei, J., & Weir, M. R. (2019). Hypertension in CKD: Core Curriculum 2019. *American journal of kidney diseases*, 74(1), 120-131. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2018.12.044>
- [9] Kuwabara, M., Kanbay, M., & Hisatome, I. (2018). Uric Acid and Hypertension Because of Arterial Stiffness. *Hypertension*, 72(3), 582-584. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11496>

- [10] Berzin, O. V., & Kondratiuk V. Ye. (2018). Kardiovaskularni zakhvoriuvannia pry podahri [Cardiovascular diseases with gout]. *Ukrainskyi naukovo-molodizhnyi zhurnal*, (3-4), 66-70. [in Ukrainian].
- [11] Holovach, I. Yu. (2020). Bezsymptomna hiperurykemiia: chy ne prokhodymo my povz problemu? [Asymptomatic hyperuricemia: are we missing the problem?]. *Simeina medytsyna*, (8), 21-27. [in Ukrainian].
- [12] Pan, A., Teng, G. G., Yuan, J. M., & Koh, W. P. (2016). Bidirectional Association between Diabetes and Gout: the Singapore Chinese Health Study. *Scientific reports*, 6, 25766. <https://doi.org/10.1038/srep25766>
- [13] Holovach, Y. Iu. (2016). Diabeticheskaia bolezn pochek: vozmozhnosti i znachenie glikemicheskogo kontrolya dlya renoproteksii [Diabetic kidney disease: possibilities and significance of glycemic control for renoprotection]. *Praktykuiuchyiy likar*, 16(5), 17-22. [in Russian].
- [14] Orlova, I. V., & Stanislavchuk, M. A. (2018). Porushennia purynovoho obminu u khvorykh na podahru: zviazok z dysadypokinemiieiu [Disorders of purine metabolism in patients with gout: relationship with dysadipokinemia]. *ScienceRise: Medical Science*, 23(3), 18-22. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.15587/2519-4798.2018.127004>
- [15] Korylchuk, N. I. (2019). Sposib zhyttia yak osnova metabolichnoho syndromu: pohliad na nashi realii [Lifestyle as the basis of the metabolic syndrome: a look at our realities]. *Visnyk sotsialnoi hihiieny ta orhanizatsii okhorony zdorovia Ukrainy*, (3), 114-123. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.11603/1681-2786.2019.3.10586>
- [16] Richette, P., Doherty, M., Pascual, E., Barskova, V., Becce, F., Castaneda, J., Coyfish, M., Guillo, S., Jansen, T., Janssens, H., Lioté, F., Mallen, C. D., Nuki, G., Perez-Ruiz, F., Pimentao, J., Punzi, L., Pywell, A., So, A. K., Tausche, A. K., Uhlig, T., ... Bardin, T. (2020). 2018 updated European League Against Rheumatism evidence-based recommendations for the diagnosis of gout. *Annals of the rheumatic diseases*, 79(1), 31-38. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-215315>
- [17] Introduction: *Standards of Medical Care in Diabetes-2020*. (2020). *Diabetes care*, 43(Suppl 1), S1-S2. <https://doi.org/10.2337/dc20-Sint>
- [18] Dobrowolski, P., Januszewicz, A., Gumprecht, J., Malyszko, J., Narkiewicz, K., Stompór, T., Tykarski, A., Więcek, A., & Prejbisz, A. (2021). Why albuminuria should be assessed more frequently in everyday clinical practice? A position statement. *Polish archives of internal medicine*, 131(4), 396-406. <https://doi.org/10.20452/pamw.15874>
- [19] Chernyaeva, A. O., & Mykytyuk, M. R. (2021). Tsystatyn C yak marker nyrkovoi funksii u khvorykh na tsukrovyi diabet z porushenniamy purynovoho obminu [Cystatin C as a marker of renal function in diabetic patients with disorders of purine metabolism]. *Aktualni problemy suchasnoi medytsyny: Visnyk Ukrainiskoi medychnoi stomatolohichnoi akademii*, 21(2), 87-92. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.31718/2077-1096.21.2.87>
- [20] Zhang, X., & Lerman, L. O. (2017). The Metabolic Syndrome and Chronic Kidney Disease. *Translational Research*. Mosby Inc. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.12.004>
- [21] Buzas, R., Tautu, O. F., Dorobantu, M., Ivan, V., & Lighezan, D. (2018). Serum uric acid and arterial hypertension—data from sephar III survey. *PLoS ONE*, 13(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199865>
- [22] Xie, N., Li, X., Zhong, Q., Zhou, D., Cai, A., Zhang, Y., Zhou, Y., & Feng, Y. (2019). Association of systolic blood pressure and pulse pressure with microalbuminuria in treatment-naïve hypertensive patients. *Archives of medical science : AMS*, 15(4), 832-836. <https://doi.org/10.5114/aoms.2018.77727>
- [23] Bajaj, N. S., Singh, A., Zhou, W., Gupta, A., Fujikura, K., Byrne, C., Harms, H. J., Osborne, M. T., Bravo, P., Andrikopolou, E., Divakaran, S., Bibbo, C. F., Hainer, J., Skali, H., Taqueti, V., Steigner, M., Dorbala, S., Charytan, D. M., Prabhu, S. D., Blankstein, R., ... Di Carli, M. F. (2020). Coronary Microvascular Dysfunction, Left Ventricular Remodeling, and Clinical Outcomes in Patients With Chronic Kidney Impairment. *Circulation*, 141(1), 21-33. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.043916>
- [24] Khimion, L. V., & Tymoshchuk, L. S. (2017). Vplyv variabelnosti arterialnogo tysku na funktsionalnyi nyrkovyi rezerv pry esentsialnii arterialnii hipertenzii I stadia [The effect of blood pressure variability on the functional renal reserve in stage I essential arterial hypertension]. *Siemieinaia meditsina*, (1), 72-79. [in Ukrainian].



## Особливості перебігу уратного нефролітіазу, коморбідного з метаболічним синдромом

А. О. Губарь <sup>ID</sup>\*A,D,E,F, М. А. Довбиш <sup>ID</sup>B,C,D,E, О. М. Міщенко <sup>ID</sup>B,C, І. М. Довбиш <sup>ID</sup>B,C

Запорізький державний медичний 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

**Мета роботи** – вивчити особливості перебігу уратного нефролітіазу та уратного нефролітіазу, коморбідного з метаболічним синдромом.

**Матеріали та методи.** Вивчили клініко-лабораторні дані 183 пацієнтів. Хворі на уратний нефролітіаз контрольної групи отримували традиційну терапію. Основна група – пацієнти з уратним нефролітіазом, що коморбідний із метаболічним синдромом, приймали квертин, традиційну терапію та лікарські засоби, які коригують метаболічні процеси. Під час дослідження застосували клініко-лабораторні, біохімічні, ультразвукові, рентгенологічні, радіоізотопні, імуноферментні та фізико-хімічні методи.

**Результати.** У пацієнтів з уратним нефролітіазом інтенсивність болю більша, ніж у хворих на уратний нефролітіаз, коморбідний із метаболічним синдромом. Крім того, в останніх посилювалися прояви запального процесу, а супутні захворювання підвищували екскрецію каменеутворювальних сполук. Метафілактика квертином на тлі відомих лікарських засобів, що корегують метаболічні процеси, позитивно впливала на перебіг уратного нефролітіазу, коморбідного з метаболічним синдромом, сприяла зменшенню рецидивів каменеутворення.

**Висновки.** Поглиблена діагностика метаболічних процесів допоможе лікареві правильно визначити диференційовану тактику лікування та обстеження, а також запобігти можливим ускладненням.

**Ключові слова:** перебіг, метафілактика, уратний нефролітіаз, метаболічний синдром, сечокам'яна хвороба, літотрипсія, перкутанна нефролітотрипсія, квертин.

**Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2022. Т. 15, № 3(40). С. 319–325**

### Features of the course urate nephrolithiasis, comorbid with the metabolic syndrome

A. O. Hubar, M. A. Dovbysh, O. M. Mishchenko, I. M. Dovbysh

**The aim** of the work is to study the peculiarities of the course of urate nephrolithiasis and urate nephrolithiasis comorbid with metabolic syndrome.

**Materials and methods.** Clinical and laboratory data of 183 patients. The control group of patients with urate nephrolithiasis received traditional therapy. The patients of the main group with urate nephrolithiasis comorbid with metabolic syndrome took quertin and traditional therapy, as well as popular medical drugs that correct metabolic processes. Clinical laboratory, biochemical, ultrasound, radiological, radioisotope, immunoenzymatic, and physical-chemical methods were used.

**Results.** The pain was more intense in patients with urate nephrolithiasis than in patients with urate nephrolithiasis comorbid with metabolic syndrome. Manifestations of the inflammatory process increased in patients with urate nephrolithiasis comorbid with metabolic syndrome, and concomitant diseases intensified the excretion of stone-forming compounds. Metaphylaxis with quertin against the background of commonly accepted drugs that correct metabolic processes had a positive effect on the course of urate nephrolithiasis comorbid with metabolic syndrome and contributed to the reduction of stone formation relapse.

**Conclusions.** In-depth diagnosis of metabolic processes can help the doctor to correctly determine the differentiated tactics of examination and treatment, as well as to prevent possible complications in a timely manner.

**Key words:** course, metaphylaxis, urate nephrolithiasis, metabolic syndrome, urolithiasis, lithotripsy, percutaneous nephrolithotripsy, quertin.

**Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 319–325**

#### ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/266616>

UDC 616.61-003.7-06:616-008.9]-036.1-084

DOI: [10.14739/2409-2932.2022.3.266616](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2022.3.266616)

**Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 319–325**

**Key words:** course, metaphylaxis, urate nephrolithiasis, metabolic syndrome, urolithiasis, lithotripsy, percutaneous nephrolithotripsy, quertin.

\*E-mail: [andreygubar76@gmail.com](mailto:andreygubar76@gmail.com)

Received: 22.07.2022 // Revised: 12.08.2022 // Accepted: 02.09.2022

Уратні камені становлять 10–20 % усіх сечових каменів; 79 % усіх уратних каменів діагностують у чоловіків, пік виявлення припадає на вік 60–65 років. Факторами ризику уратного нефролітіазу (УН) є гіперурикемія, гіперурикозурія, малий об'єм і рН сечі [1].

УН – поліетіологічне захворювання, спричинене взаємодією ендогенних та екзогенних факторів, генотипу. У більшості випадків виникнення УН залежить від розладів пуринового обміну. Основні напрями утворення сечової кислоти, основного метаболіту пуринового обміну, – пурини, що містяться в їжі, пурини, що утворюються при тканинному розладі та синтезі [2]. Порушення пуринового обміну може призвести до виникнення УН у разі нормального вмісту сечової кислоти у сироватці крові при підвищеній її продукції в печінці внаслідок посиленого виведення нирками, а також гіперурикемії, якщо підвищена продукція сечової кислоти в печінці та спостерігають суттєву її екскрецію нирками.

Найчастіше захворювання, що посилює ризик УН, – метаболічний синдром (МС) [2]. Між МС і УН спостерігають очевидний патогенетичний зв'язок. На МС зараз хворіють до 15–39 % населення планети. Зазначимо, що хворі з МС мають підвищений ризик розвитку ниркових конкрементів. Чим більше компонентів МС (абдомінальне ожиріння, гіпертонічна хвороба, гіперліпідемія, порушення толерантності до глюкози), тим частіше виникають уратні камені [3].

Виявили також зв'язок між частотою виникнення УН та ожирінням. У осіб віком менше ніж 60 років частота УН більше пов'язана з індексом маси тіла (ІМТ), а в пацієнтів старшого ризику виникнення уратних каменів збільшується прямо пропорційно віку [4].

Поєднання УН із компонентами МС дещо змінює клінічну картину та перебіг захворювання. Тому своєчасне та ефективне лікування УН та УН, коморбідного з МС, з одночасною діагностикою цих захворювань актуальні не тільки в аспекті надання невідкладної допомоги хворому, але й для запобігання загальним процесам у нирці та рецидивам УН.

## Мета роботи

Вивчити особливості перебігу уратного нефролітіазу та уратного нефролітіазу, коморбідного з метаболічним синдромом.

## Матеріали і методи дослідження

Матеріал для дослідження – клініко-лабораторні дані 183 хворих на УН та УН, коморбідний з МС, які перебували на лікуванні протягом 2012–2020 років. Основна група – хворі на УН, коморбідний із МС, включала 124 пацієнтів. У цю групу залучили 36 (29 %) чоловіків і 88 (71 %) жінок віком 42–79 років. Пацієнти основної групи отримували квертин 40 мг по 1 таблетці тричі на добу за 30 хвилин до їди на тлі традиційної терапії та лікарських засобів, що корегують метаболічні процеси. У контрольну групу залучили 59 хворих на УН (35 чоловіків – 59,3 %, 24

жінки – 40,7 %) віком 22–72 років. Пацієнти контрольної групи отримували препарати традиційної терапії (Ріабал 30 мг по 1 таблетці тричі на добу; нестероїдний протизапальний препарат Дексалгін 50 мг 3 мл при болях внутрішньом'язово; Ураліт У в гранулах по 2,5 г 2–3 рази на добу залежно від рН сечі (6,2–6,8)), водний удар.

Під час дослідження використали клініко-лабораторні, ультразвукові, рентгенологічні, радіоізотопні, імунологічні методи. Здійснили фізико-хімічні дослідження – визначення складу каменів методом рідинної хромато-мас-спектрометрії, застосували прилад LC/MS: Agilent 1260 Infinity HPLC System (дегазатор, бінарний насос, автосамплер, термостат колонки, діодно-матричний детектор), а також одноквадрупольний мас-спектрометр Agilent 6120 з іонізацією в електроспреї (ESI); Open LAB CDS Software.

Результати дослідження опрацювали стандартними статистичними методами аналізу на персональному комп'ютері, використавши програми Microsoft Office Excel 2007 та Statistica for Windows 13.0 (Statsoft Inc., № ліцензії JPZ804I382130ARC10-J). Достовірність міжгрупових відмінностей розраховували за допомогою параметричних t-критеріїв Ст'юдента та хі-квадрат ( $\chi^2$ ) Пірсона. Застосували 3 рівні статистичної значущості відмінностей результатів досліджень –  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  та  $p < 0,001$ .

## Результати

У результаті дослідження виявили вірогідне збільшення маси тіла до лікування у хворих на УН, коморбідний із МС. Так, ІМТ у хворих основної групи вірогідно більший ( $35,0 \pm 0,4$  кг/м<sup>2</sup>;  $p < 0,05$ ) на початку лікування порівняно з пацієнтами з УН контрольної групи ( $23,3 \pm 0,2$  кг/м<sup>2</sup>). Через 1,5–6,0 місяця спостереження ІМТ невірогідно зменшився, але залишився майже на тому самому рівні ( $33,2 \pm 0,4$  кг/м<sup>2</sup>).

Під час аналізу результатів обстеження хворих на УН, коморбідний із МС, та УН, у яких була ниркова колька (НК), виявили: пацієнтів із нападом кільки госпіталізували через 3,9 дня після початку захворювання. Протягом цього періоду допомогу надавали лікарі швидкої допомоги чи в поліклініці, деякі хворі приймали медикаменти самостійно. Тільки 36 % пацієнтів госпіталізовані протягом першої доби з часу початку захворювання.

Тривалість НК у групі хворих на УН, коморбідний із МС, становила в середньому 3,5 доби, а в пацієнтів з УН – 3,9 доби. Тільки у 19 % випадків напади болю у хворих на УН повторювалися протягом однієї доби, у 81 % пацієнтів вони продовжувалися від 2 до 7–8 діб. В основній групі в 14 % випадків напади болю тривали протягом однієї доби, в 70 % продовжувалися від 1 до 4 днів. Кількість нападів у середньому становила 2,6 та 4,0 рази щодоби у хворих основної та контрольної груп відповідно. У 21 % пацієнтів з УН фіксували один напад болю протягом доби, у 28 % – 2, у 31 % – 3, у 20 % випадків – 4 і більше нападів протягом доби. В основній групі один напад протягом доби зареєстрували в 25 %

Таблиця 1. Характеристика клінічних симптомів ниркової кольки у хворих на УН

Симптом	До лікування				Через 3 доби				$\chi^2$	p
	Основна група		Контрольна група		Основна група		Контрольна група			
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%		
Нападоподібний біль	124	100	59	100	30	24	19	32	23	<0,001
Іррадіація болю	103	83	54	91	24	15	21	35	5,3	<0,02
Еритроцитурія	99	79	49	83	25	20	22	37	5,2	<0,02
Рухове збудження	94	75	55	93	8	6	20	33	15,3	<0,001
Дизурія	80	64	50	84	24	15	23	38	7,5	<0,001

Таблиця 2. Визначення інтенсивності болю при нападі НК у хворих на УН

	До лікування				Через 3 доби				$\chi^2$	p
	Основна група		Контрольна група		Основна група		Контрольна група			
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%		
Кількість балів	5	50	9	90	2	20	4	40	23,4	<0,001

пацієнтів, у 26 % – 2, у 30 % – 3, у 19 хворих – 4 і більше нападів упродовж доби.

У клінічній картині УН від часу надходження у 45,9 % випадків спостерігали озноби, у 49,1 % – визначили суб-фебрильну температуру тіла (37,2–37,3 °С). У 48,9 % пацієнтів з УН основної групи зафіксували озноби, у 53,2 % – підвищення температури тіла до 37,2–37,3 °С. Як правило, підвищення температури визначали в осіб, у яких напади тривали більше ніж 4 доби, а частота кольок становила 3 і більше разів.

Спостереження дали змогу визначити найчастіші 5 клінічних ознак (табл. 1), що характерні для НК: гострий нападоподібний біль у проєкції нирки, іррадіація болю вздовж сечовода в клубово-пахвинну ділянку та зовнішні статеві органи, рухове збудження хворих, порушення сечовипускання та зміна (потемніння) кольору сечі. Перша і головна ознака – гострий нападоподібний біль, який визначили у 100 % випадків. Через 3 доби з-поміж 124 хворих основної групи на біль скаржилися тільки 30 (24 %); це вірогідно в 4,2 раза рідше порівняно з вихідними даними ( $\chi^2 = 23,4$ ;  $p < 0,001$ ). У разі виникнення нападу НК характерну іррадіацію болю в пахвинно-каліткову ділянку на третю добу зафіксували у 24 (19 %) пацієнтів основної групи; це в 4,3 раза рідше, ніж на початку лікування, а також у 2,3 раза рідше порівняно з пацієнтами контрольної групи ( $\chi^2 = 5,33$ ;  $p < 0,02$ ).

Характер іррадіації болю вздовж сечоводів і в статеві органи виявили в 91 % пацієнтів з УН та 83 % хворих на УН, коморбідний із МС. На третьому місці за частотою виявлення – еритроцитурія. Її визначили в 83 % осіб з УН і 79 % хворих на УН, коморбідний із МС. Далі за частотою – рухове збудження (у 55 % хворих на УН та 75 % пацієнтів з УН, коморбідний із МС) та дизурія (у 50 % осіб із УН і 64 % хворих на УН, коморбідний з МС).

Для визначення інтенсивності болю в хворих на УН застосували візуальну аналогову шкалу (ВАШ) [4–6].

За даними, що наведені в таблиці 2, у пацієнтів з МС основної групи інтенсивність болю на початку лікування вірогідно менша (5 балів) порівняно з хворими на УН (9 балів). За даними деяких авторів [5,6], це зумовлено більшою вираженістю атеросклеротичних і діабетичних уражень нервових рецепторів при МС. Через 3 доби інтенсивність болю зменшилась у пацієнтів обох груп, але в осіб контрольної групи він вірогідно двічі (4 бали) сильніший, ніж у пацієнтів з УН, коморбідним із МС (2 бали).

Крім того, в клінічній картині НК виявляли ознаки, що виникали внаслідок порушень функції інших органів і систем, як-от реакції серцево-судинної системи (підвищення артеріального тиску, тахікардія) та диспептичні явища (нудота, блювота, зниження апетиту). Симптоми першої групи турбували 96 % і 98 % пацієнтів контрольної та основної груп відповідно, другої групи – 70 % і 75 % випадків за групами дослідження відповідно.

У хворих на УН обох груп креатинін сироватки крові (табл. 3) невірогідно підвищений: до  $108,0 \pm 6,2$  мкмоль/л ( $p_1 > 0,5$ ) і  $106,0 \pm 6,3$  мкмоль/л ( $p < 0,2$ ) відповідно щодо норми, не мав значущої різниці у групах пацієнтів. Через 3 доби у хворих основної групи визначили тенденцію до зменшення рівня креатиніну –  $102,0 \pm 6,1$  мкмоль/л. У контрольній групі показник вірогідно збільшився порівняно з вихідними даними, становив  $120,0 \pm 7,0$  мкмоль/л ( $p < 0,05$ ). На 7 добу цей показник у хворих основної групи досяг нормальних значень ( $98,0 \pm 5,2$  мкмоль/л), а в контрольній групі його рівень вищий, становив  $112,0 \pm 6,6$  мкмоль/л ( $p < 0,2$ ). До 14 доби креатинін крові у хворих обох груп прийшов до норми, становив  $96,0 \pm 6,4$  мкмоль/л і  $94,0 \pm 5,3$  мкмоль/л відповідно.

Клубочкова фільтрація (КФ) та кліренс ендogenous креатиніну (Scr) на початку лікування у хворих основної та контрольної груп вірогідно менші (табл. 3) від норми ( $95,0 \pm 6,9$  мл/хв) та становили  $75,0 \pm 5,6$  мл/хв ( $p < 0,02$ ).

Таблиця 3. Креатинін крові (мкмоль/л), кліренс ендogenous креатиніну та клубочкова фільтрація (мл/хв) у хворих на УН

Термін	Показники	Основна група			Контрольна група		
		C	Ccr	F	C	Ccr	F
До лікування	n	124	33	33	59	26	26
	M ± m	108,0 ± 6,2	75,0 ± 5,6	75,0 ± 5,6	106,0 ± 6,3	77,0 ± 5,6	77,0 ± 5,6
	p, p <sub>1</sub>	<0,2, >0,5	<0,02, >0,50	<0,02, >0,50	<0,2	<0,05	<0,05
3 доба	n	85	30	30	30	25	25
	M ± m	102,0 ± 6,1	85,0 ± 5,4	85,0 ± 5,4	120,0 ± 7,0	65,0 ± 4,6	65,0 ± 4,6
	p, p <sub>1</sub>	>0,5, <0,5	>0,2, <0,01	>0,20, <0,01	<0,05	<0,001	<0,001
7 доба	n	74	28	28	30	25	25
	M ± m	98,0 ± 5,2	92,0 ± 6,1	92,0 ± 6,1	112,0 ± 6,6	74,0 ± 5,5	74,0 ± 5,5
	p, p <sub>1</sub>	>0,5, <0,1	>0,50, <0,05	>0,50, <0,05	<0,2	<0,02	<0,02
14 доба	n	66	35	35	26	25	25
	M ± m	96,0 ± 6,4	94,0 ± 6,4	94,0 ± 6,4	94,0 ± 5,3	92,0 ± 5,7	92,0 ± 5,7
	p, p <sub>1</sub>	>0,5, >0,5	>0,5, >0,5	>0,5, >0,5	>0,5	>0,5	>0,5
Норма	n	26	26	26	–	–	–
	M ± m	96,9 ± 6,7	95,0 ± 6,9	95,0 ± 6,9	–	–	–

p: вірогідність щодо норми; p<sub>1</sub>: вірогідність різниці між групами; C: креатинін; Ccr: кліренс креатиніну; F: клубочкова фільтрація.

Таблиця 4. Показники радіоізотопної ренографії у хворих із нападом ниркової кольки, M ± m

Показник, одиниці вимірювання	Термін лікування, доби				Норма
	До лікування	5	14	60	
<b>Основна група, n = 27</b>					
T <sub>макс</sub> , хв	6,30 ± 0,28 p < 0,001	5,50 ± 0,26 p < 0,001	4,10 ± 0,25** p < 0,1	3,60 ± 0,24 p > 0,5	3,50 ± 0,24
T <sub>1/2</sub> , хв	24,30 ± 1,22 p < 0,001	19,40 ± 0,72* p < 0,001	10,50 ± 0,51** p < 0,001	8,60 ± 0,41 p > 0,5	8,20 ± 0,42
ПВ, %	52 ± 2 p > 0,5	52 ± 2 p > 0,5	51 ± 2 p > 0,5	50 ± 2 p > 0,5	50 ± 2
<b>Контрольна група, n = 27</b>					
T <sub>макс</sub> , хв	6,40 ± 0,28 p < 0,001	6,20 ± 0,27 p < 0,001	5,60 ± 0,26 p < 0,001	3,70 ± 0,25 p > 0,5	–
T <sub>1/2</sub> , хв	24,50 ± 1,24 p < 0,001	22,80 ± 1,21 p < 0,001	14,20 ± 0,52 p < 0,001	9,20 ± 0,43 p < 0,1	–
ПВ, %	52 ± 2 p > 0,5	52 ± 2 p > 0,5	52 ± 2 p > 0,5	50 ± 2 p > 0,5	–

і 77,0 ± 5,6 мл/хв (p < 0,05) відповідно. Через 3 доби КФ в основній групі збільшилась на 13 % (85,0 ± 5,4 мл/хв, p > 0,2) щодо початкових значень. У цей термін дослідження КФ у пацієнтів контрольної групи вірогідно зменшилась і щодо норми, і щодо показника основної групи (65,0 ± 4,6 мл/хв, p < 0,001). Через 7 діб КФ у хворих основної групи нормалізувалась (92,0 ± 6,1 мл/хв), а у пацієнтів з УН залишалась на рівні 74,0 ± 5,5 мл/хв (p < 0,02). Через 14 діб у пацієнтів контрольної групи КФ майже досягла показників здорових людей (92,0 ± 5,7 мл/хв).

Під час визначення функції кожної нирки окремо, за даними радіоізотопної ренографії (табл. 4), виявили: в

усіх хворих на УН до лікування з боку ураженої нирки фіксували збільшення часу максимального накопичення (T<sub>макс</sub>) <sup>131</sup>I-гіпурану. В основній групі він становив 6,30 ± 0,28 хв (p < 0,001), у контрольній – 6,40 ± 0,28 хв (p < 0,001); норма – 3,50 ± 0,24 хв. Водночас погіршився час напіввиведення (T<sub>1/2</sub>) радіофармпрепарату, що збільшився до 24,30 ± 1,22 хв в основній та 24,50 ± 1,24 хв у контрольній групі (p < 0,001). Показник Вінтера (ПВ) не мав суттєвих змін у всіх хворих (52 ± 2 %; p > 0,5) порівняно з нормальними значеннями.

Через 5 діб у хворих основної групи виявили помірне зменшення T<sub>макс</sub> до 5,50 ± 0,26 хв; це на 12,7 % менше,



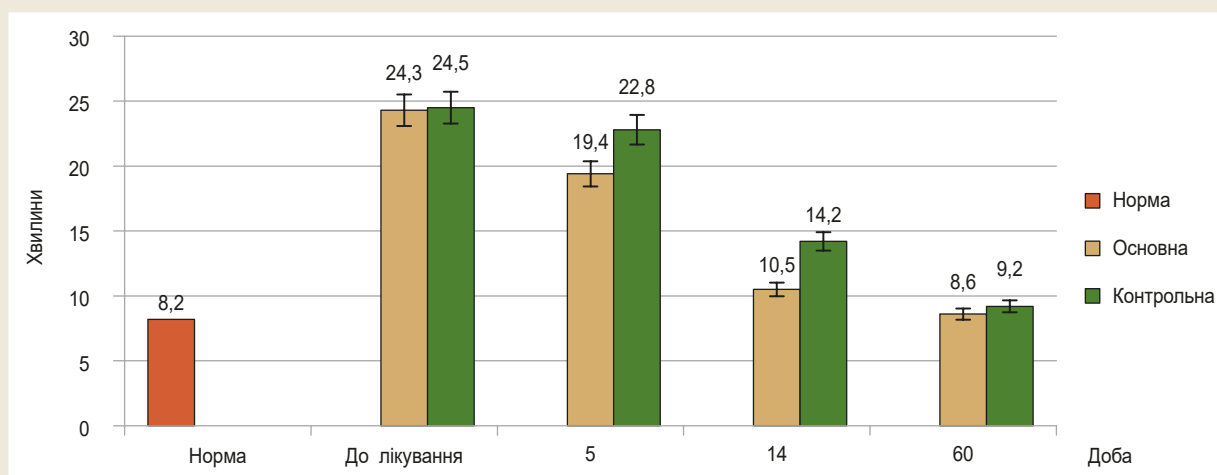


Рис. 1. Період напіввиведення  $^{131}\text{I}$ -гіпурану у хворих на УН із нападом ниркової кольки під час лікування біофлавоноїдами та традиційними засобами.

ніж у контрольній групі. Одночасно покращувався  $T_{1/2}$  препарату, що становив  $19,40 \pm 0,72$  хв і був вірогідно меншим, ніж при традиційній терапії. Показник Вінтера залишався на попередньому рівні. На 14 добу покращувались секреторно-екскреторні процеси в нирках пацієнтів основної групи.  $T_{\text{макс}}$  зменшився до  $4,10 \pm 0,25$  хв, а  $T_{1/2}$  препарату становив  $10,50 \pm 0,51$  хв; це вірогідно менші показники порівняно з такими в контрольній групі.

У віддаленому періоді (через 60 діб) у разі призначення квертину і засобів згідно з чинним протоколом лікування функціональна здатність нирки майже нормалізувалася. Час накопичення  $^{131}\text{I}$ -гіпурану становив  $3,60 \pm 0,24$  хв, а період  $T_{1/2}$  –  $8,60 \pm 0,41$  хв. Показник Вінтера в цей строк дослідження – на рівні нормальних величин.

У пацієнтів контрольної групи через 5 діб (рис. 1) спостерігали помірне зменшення  $T_{\text{макс}}$  до  $6,20 \pm 0,27$  хв, але показник залишався на 12,7 % більшим, ніж у хворих основної групи. Час напіввиведення препарату покращувався ( $22,80 \pm 1,21$  хв), але залишався вірогідно більшим порівняно з показником в основній групі.

Через 14 діб спостерігали покращення секреторно-екскреторних процесів у нирках хворих, які отримували традиційну терапію.  $T_{\text{макс}}$  у цей термін зменшився до  $5,60 \pm 0,26$  хв ( $p < 0,001$ ), але залишився вірогідно більшим, ніж після терапії, що включала квертин. Незважаючи на те, що  $T_{1/2}$  радіофармпрепарату зменшився та становив  $14,20 \pm 0,52$  хв ( $p < 0,001$ ), він залишався більшим за показник в основній групі. Показник Вінтера помірно зменшився, наблизився до нормальних значень. На 60 добу функція нирки при традиційній терапії майже досягла нормальних показників. Час накопичення  $^{131}\text{I}$ -гіпурану становив  $3,70 \pm 0,25$  хв, а період напіввиведення –  $9,20 \pm 0,43$  хв. Це на 7 % менше, ніж у пацієнтів основної групи.

У процесі лікування НК лікарські засоби неефективні у 31,7 % хворих. Однак, незважаючи на терапію, у багатьох пацієнтів з УН виникав пієлонефрит. В контрольній

групі у 28 (47 %) хворих виявили ознаки хронічного пієлонефриту, у 5 (8 %) осіб – ознаки хронічної хвороби нирок (ХХН) I–II стадій, пієлоектазію діагностували в 45 (76,2 %) пацієнтів. В основній групі хворих на УН, коморбідний із МС, які отримували квертин, хронічний пієлонефрит виявили у 88 (71 %) випадках, ознаки ХХН I–II стадій – у 5 (4 %), пієлоектазію – у 55 (44 %) пацієнтів.

У процесі метафілактики покращувалися показники функціонального стану нирок, пуринового обміну, зменшувалася екскреція каменеутворювальних сполук і підвищувався рівень інгібіторів кристалізації; це позитивно позначалося на клінічному перебігу УН. Протягом лікування частота рецидивів каменеутворення становила в контрольній групі 14 (23,7 %) випадків із 59, а з-поміж хворих на УН, коморбідний з МС (основна група), у 13 (10,4 %), і це в 2,3 раза менше, ніж у контролі. Відповідно, зменшилися кількість атак пієлонефриту та частота НК.

## Обговорення

Лікування хворих на УН, коморбідний із МС, квертином на тлі традиційної терапії та лікарських засобів, що корегують метаболічні порушення, протягом 6 місяців призводило до незначного зниження маси тіла та ІМТ.

Клінічні симптоми у хворих на УН, коморбідний із МС, та осіб з УН майже не відрізнялися. Втім, у багатьох випадках перші симптоми (біль, макро- та мікрогематурія, дизурія та відходження конкрементів) у пацієнтів із УН, що коморбідний із МС, виникали пізніше, ніж у хворих без МС [7].

У хворих на УН клінічна картина НК більш виражена, ніж у пацієнтів з УН, що коморбідний із МС. Інтенсивність болю при нападах НК у хворих основної групи менша, ніж у пацієнтів з УН. При цьому особи з МС менш рухливі, і це також зменшувало больовий поріг і зумовлювало менш виразні клінічні прояви захворювання. У таких хворих часто спостерігають формування коралоподібних каменів, що знижує прояви симптоматики

і робить клінічну картину менш вираженою. У хворих на УН превалювали конкременти дрібного та середнього розмірів, які спричиняли сильніші больові відчуття, коли вони рухалися та видалялися із сечовидільних шляхів [8,9].

Клінічні спостереження дали змогу розрізнити 4 види НК залежно від особливостей клінічного перебігу та наявності ускладнень:

1. Проста НК характеризувалася одноразовим больовим нападом, що легко купірували спазмолітиками й анальгетиками;

2. Рецидивна НК – два та більше нападів протягом доби, що купірували медикаментозно;

3. НК, що не купірується, – напади, на які не впливало багаторазове введення спазмолітиків та анальгетиків; одночасно виявляли субфібрилітет внаслідок рефлексів, помірний лейкоцитоз у крові та паличкоядерні зрушення;

4. Ускладнена НК (гострим пієлонефритом або загостренням хронічного пієлонефриту) – виникнення одно- або багаторазових нападів із підвищенням температури тіла до високих цифр з ознобом, а також лейкоцитоз і паличкоядерні зрушення в периферичній крові.

У хворих на УН спостерігали помірне зниження азотовидільної функції нирок. Протягом лікування у пацієнтів основної групи, яким призначили квертин, вона нормалізувалася вже через 3 доби, а КФ – на 7 добу. У пацієнтів контрольної групи креатинін крові та КФ нормалізувалися лише на 14 добу.

У хворих основної групи перебіг УН, коморбідного із МС, характеризувався вірогідним зниженням секреторно-екскреторних процесів ураженої нирки. У разі призначення квертину на тлі звичайної терапії через 14 діб відновлювалася секреторна здатність нирки, а екскреторна залишалася вірогідно меншою за норму, але перевищувала відповідний показник контрольної групи. При традиційній терапії секреторно-екскреторні процеси в нирці через 14 діб залишалися зниженими, в 1,6–1,7 раза вірогідно перевищували нормальні показники. На 60 добу незалежно від методу лікування секреторно-екскреторні показники відновлювалися.

Перебіг УН у хворих характеризувався частими НК, під час яких інтенсивність нападодібного болю в пацієнтів із МС була менш виражена, за даними візуальної аналогової шкали [5,6], із частішим виникненням ускладнень, зокрема пієлонефриту, та в 2,3 раза рідшим рецидивним каменеутворенням.

## Висновки

1. Перебіг УН характеризувався розвитком частих, рецидивних НК, інтенсивність яких у пацієнтів із МС вірогідно вдвічі менш виражена порівняно з показником хворих на УН.

2. Клінічна картина у хворих на УН, коморбідний із МС (71 %), у 1,5 раза частіше ускладнилася запаленням нирки порівняно з пацієнтами з УН (47 %).

3. Перебіг УН у хворих на УН, що коморбідний із МС, порівняно з пацієнтами з УН, призводив до

вірогідно сильнішого порушення азотовидільної функції нирок, зменшення швидкості клубочкової фільтрації, погіршення секреторно-екскреторної здатності нирок.

4. У хворих на УН, коморбідний із МС, на тлі застосування біофлавоноїдів (квертину) через 14 діб відновлювалася секреторна здатність нирки, а екскреторна залишалася вірогідно більшою за норму, але меншою щодо показника контрольної групи. В контрольній групі (терапія згідно з чинними клінічними протоколами) секреторно-екскреторні процеси у нирці через 14 діб залишалися нижчими, в 1,6–1,7 раза вірогідно перевищували нормальні величини.

5. Правильне кількісне оцінювання інтенсивності болю у хворих на УН має бути першим кроком у комплексі заходів медикаментозної терапії та відновлення пасажу сечі. Це безпосередньо впливає на ефективність і адекватність обраного методу лікування та має бути рутинною практикою в роботі лікарів.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

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

## Відомості про авторів:

Губарь А. О., канд. мед. наук, доцент каф. урології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0002-8198-128X](https://orcid.org/0000-0002-8198-128X)

Довбиш М. А., д-р мед. наук, професор каф. урології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0001-8920-8139](https://orcid.org/0000-0001-8920-8139)

Мищенко О. М., асистент каф. анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0002-3457-231X](https://orcid.org/0000-0002-3457-231X)

Довбиш І. М., асистент каф. урології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0002-8767-5443](https://orcid.org/0000-0002-8767-5443)

## Information about authors:

Hubar A. O., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Urology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Dovbysh M. A., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Urology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Mischenko O. M., Assistant of the Department of Human Anatomy, Operative Surgery and Topographic Anatomy, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Dovbysh I. M., Assistant of the Department of Urology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

## Список літератури

- [1] Kidney stones : a fetal origins hypothesis / S. A. Howies, M. H. Edwards, C. Cooper, R. V. Frakker. *Journal of bone and mineral research*. 2013. Vol. 28, Iss. 12. P. 2535-2539. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1993>
- [2] Нові можливості в корекції гіперурикемії у хворих на сечокам'яну хворобу та сечокислу гіперкристалурію / В. В. Черненко, В. Й. Савчук, Н. І. Желтовська та ін. *Здоров'я чоловіки*. 2019. № 3. С. 70-73.
- [3] Домбровский Я. А. Медикаментозное лечение мочекаменной болезни при помощи цитратной терапии. *Почки*. 2014. № 1. С. 74-78.
- [4] Sakhaee K., Maalouf N. M., Sinnott B. Clinical review. Kidney stones 2012: pathogenesis, diagnosis, and management. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012. Vol. 97, Iss. 6. P. 1847-1860. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-3492>
- [5] Сапон Н. А. Нейропсихологические критерии оценки невропатического болевого синдрома. *Український нейрохірургічний журнал*. 2005. № 1. С. 34-40.

- [6] Morgan M. S., Pearle M. S. Medical management of renal stones. *BMJ (Clinical research ed.)*. 2016. Vol. 352. i52. <https://doi.org/10.1136/bmj.i52>
- [7] Daudon M., Lacour B., Jungers P. Influence of body size on urinary stone composition in men and women. *Urological research*. 2006. Vol. 34, Iss. 3. P. 193-199. <https://doi.org/10.1007/s00240-006-0042-8>
- [8] Довбиш М. А. Лікування гострих обструкцій верхніх сечових шляхів. *Актуальні питання урології: матеріали Всеукр. наук-практ. конф.* Чернівці, 16-17 жовт. 2003 р. Чернівці. 2003. С. 52-55.
- [9] Сучасний погляд на бездренажну перкутанну нефролітотрипсію / С. О. Возіанов, А. І. Сагалевич, А. І. Бойко та ін. *Запорізький медичний журнал*. 2021. Т. 23, № 4. С. 575-582. <https://doi.org/10.14739/2310-1210.2021.4.226895>

#### References

- [1] Howles, S. A., Edwards, M. H., Cooper, C., & Thakker, R. V. (2013). Kidney stones: a fetal origins hypothesis. *Journal of bone and mineral research*, 28(12), 2535-2539. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1993>
- [2] Chernenko, V. V., Savchuk, V. Y., Zheltovska, N. I., Chernenko, D. V., & Bondarenko, Yu. M. (2019). Novi mozhlivosti v korektsii hiperurikemii u khvorykh na sechokamianu khvorobu ta sechokyslu hiperkrystaluriiu [Current possibilities in the correction of hyperuricemia in patients with urolithiasis and uric acid hypercrystallization]. *Zdorove muzhchyny*, (3), 70-73. [in Ukrainian].
- [3] Dombrovskii, Ya. A. (2014). Medikamentochnoe lechenie mochekamennoi bolezni pri pomoshchi tsitratnoi terapii [Drug treatment of urolithiasis with citrate therapy]. *Pochki*, (1), 74-78. [in Russian].
- [4] Sakhaee, K., Maalouf, N. M., & Sinnott, B. (2012). Clinical review. Kidney stones 2012: pathogenesis, diagnosis, and management. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 97(6), 1847-1860. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-3492>
- [5] Sapon, N. A. (2005). Neiropsikhologicheskie kriterii otsenki nevropaticheskogo boleвого sindroma [Neuropsychological criteria for assessing neuropathic pain syndrome]. *Ukrainskyi neirokhirurhichnyi zhurnal*, (1), 34-40. [in Russian].
- [6] Morgan, M. S., & Pearle, M. S. (2016). Medical management of renal stones. *BMJ (Clinical research ed.)*, 352, i52. <https://doi.org/10.1136/bmj.i52>
- [7] Daudon, M., Lacour, B., & Jungers, P. (2006). Influence of body size on urinary stone composition in men and women. *Urological research*, 34(3), 193-199. <https://doi.org/10.1007/s00240-006-0042-8>
- [8] Dovbysh, M. A. (2003). Likuvannia hostrykh obstruktsii verkhnikh sechovykh shliakhiv [Treatment of acute obstruction of the upper urinary tract]. *Aktualni pytannia urolohii*. Proceedings of the All-Ukrainian scientific-practical conference (pp. 52-55). Chernivtsi. [in Ukrainian].
- [9] Vozianov, S. O., Sahalevych, A. I., Boiko, A. I., Haiseniuk, F. Z., Kohut, V. V., Dzhuran, B. V., & Sosnin, M. D. (2021). Suchasnyi pohliad bezdrenazhnu perkutannu nefrolitotripsyiu [A modern view on tubeless percutaneous nephrolithotomy]. *Zaporozhye medical journal*, 23(4), 575-582. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.14739/2310-1210.2021.4.226895>



# Study of the preferences of doctors and pharmacists regarding medicines for the treatment of diseases of the peripheral nervous system

T. S. Brytanova \*1,A,B,C,D,F, T. P. Zarichna 1,A,C,E,F, A. S. Hotsulia 1,A,C,E,F, Yu. V. Shostak 2,B,E,D

<sup>1</sup>Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine, <sup>2</sup>B-pharma Ltd., Kyiv, 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

**The aim of the work** is to assess the preferences of doctors and pharmaceutical workers regarding drugs for the treatment of diseases of the peripheral nervous system in order to optimize the medical supply of the population.

**Materials and methods.** Data from the State Register of Medicines of Ukraine, Compendium-online, questionnaires of neurologists and pharmaceutical workers were used in this research. The search systematic, analytical, qualimetric, comparative, statistical analyses were used in the work.

**Results.** The results of a survey of neurologists revealed that for the treatment of diseases of the peripheral nervous system (radiculopathy, radiculargia) the most effective treatment regimen is that, which includes “Nucleo CMF Forte”, “Celtican” and “Mielofan”. The effectiveness and safety of the studied drugs were confirmed by qualimetric analysis. However, the results of consumer surveys showed that the latter prefer a treatment regimen that contains “Dicloberl”, “Ketanov” and “Dexalgin”. These drugs are the most irrational in terms of side effects and contraindications. For consumers, the importance of the pharmacological effect outweighs the effects on the body from the side effects of drugs.

**Conclusions.** The study of the preferences of doctors and pharmacists regarding medicines for the treatment of radiculopathy and radiculargia was conducted. The most rational treatment regimens are identified, the effectiveness of which is confirmed by the method of qualitative analysis.

**Key words:** diseases of the peripheral nervous system, treatment regimens, drugs, pharmacists, doctors.

**Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 326–329**

## Дослідження уподобань лікарів і фармацевтичних працівників щодо лікарських засобів для лікування захворювань периферичної нервової системи

Т. С. Британова, Т. П. Зарічна, А. С. Гоцуля, Ю. В. Шостак

**Мета роботи** – оцінювання уподобань лікарів і фармацевтичних працівників щодо лікарських засобів для лікування захворювань периферичної нервової системи для оптимізації лікарського забезпечення населення.

**Матеріали та методи.** Для здійснення аналізу використали відомості Державного реєстру лікарських засобів, Компендіум-онлайн та анкет лікарів-неврологів, фармацевтичних працівників. Під час роботи застосували методи систематичного, аналітичного, кваліметричного, порівняльного та статистичного аналізу.

**Результати.** Результати анкетування лікарів-неврологів дали змогу встановити, що для лікування захворювань периферичної нервової системи (радикулопатії, радикулагії) найефективнішою є схема лікування, що передбачає призначення Нуклео ЦМФ форте, Келтікану та Мієлофану. Ефективність і безпеку досліджуваних лікарських засобів підтверджено методом кваліметричного аналізу. Втім, результати анкетування фармацевтичних працівників показали, що споживачі віддають перевагу схемі лікування, яка включає Диклоберл, Кетанов і Дексалгін. Ці лікарські засоби – найбільш нераціональні в аспекті побічних впливів і протипоказань. Для споживачів важливість фармакологічного ефекту превалює над наслідками для організму від побічних дій ліків.

**Висновки.** Здійснили дослідження уподобань лікарів і фармацевтичних працівників щодо лікарських засобів для терапії радикулопатій і радикулагій. Визначили найбільш раціональні схеми лікування, ефективність яких підтверджена методом кваліметричного аналізу.

**Ключові слова:** хвороби периферичної нервової системи, схеми лікування, лікарські засоби, фармацевтичні працівники, лікарі.

**Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2022. Т. 15, № 3(40). С. 326–329**

### ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/263550>

UDC 615.21.015.03

DOI: [10.14739/2409-2932.2022.3.263550](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2022.3.263550)

**Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 326–329**

**Key words:** diseases of the peripheral nervous system, treatment regimens, drugs, pharmacists, doctors.

\*E-mail: [goculyats@gmail.com](mailto:goculyats@gmail.com)

Received: 01.08.2022 // Revised: 26.08.2022 // Accepted: 02.09.2022

Neurological manifestations of osteochondrosis account for 60 % to 70 % of all diseases of the peripheral nervous system, and vertebrogenic radiculopathies account for 8 % to 10 % of other complications of osteochondrosis of the spine. Most often, people of working age (from 30 to 60 years) suffer from back pain. This disease has a tendency to prolonged course with repeated relapses, which often lead not only to temporary but also permanent disability [1].

Age is a primary risk factor, as it occurs secondary to the degenerative process within the spinal column. Symptoms typically begin in midlife, with men often affected in the 40s while women are affected in the 50s and 60s [2,3]. Females have a higher risk in certain populations, with physically demanding careers such as service in the military. In the general population, there is a male preponderance. Degenerative spondyloarthropathies are the primary cause of lumbar radiculopathy [4]. Patients commonly present with back pain that is associated with their radiculopathy. By definition, radiculopathy describes pain that radiates down the legs and is often described by patients as electric, burning, or sharp. The most common underlying cause of radiculopathy is irritation of a particular nerve, which can occur at any point along the nerve itself and is most often a result of a compressive force. In the case of lumbar radiculopathy, this compressive force may occur within the thecal sac, as the nerve root exits the thecal sac within the lateral recess, as the nerve root traverses the neural foramina or even after the nerve root as exited the foramina. It may be related to disc bulging or herniation, facet or ligamentous hypertrophy, spondylolisthesis, or even neoplastic and infectious processes. The diagnosis of the causative agent and subsequent treatment starts with a thorough physical exam [5].

Traditional therapy is mainly aimed at eliminating the symptoms of the disease and therefore is not always effective. Overloading of the pharmaceutical market, along with the growth of pathologies, makes it urgent to find the most optimal treatment, where trust in the drug must be reasonable and unquestionable. Pathogenetic therapy has significant advantages, especially if it has a multifactorial effect, which reduces the likelihood of side effects along with increased effectiveness [6]. Currently, a small number of active components are available that act at the level of peripheral nerves and promote their physiological regeneration [7].

## Aim

The aim of the work is to assess the preferences of doctors and pharmaceutical workers regarding drugs for the treatment of diseases of the peripheral nervous system in order to optimize the medical supply of the population.

## Materials and methods

Data from the State Register of Medicines of Ukraine, Compendium-online, questionnaires of neurologists and pharmaceutical workers were used in this research. The search systematic, analytical, qualimetric, comparative, statistical analyses were used in the work [8,9].

The following data from patients with this pathology were used in this study: sex, age of the patient, diagnosis, duration of treatment, patients' opinion regarding the results of the treatment of drugs included in the proposed treatment regimens.

To study the opinion of pharmacists with this pathology on the effectiveness of drugs included in these treatment regimens, a questionnaire was proposed, which contains the following questions: age, sex, lifestyle, frequency of visits to a neurologist for this pathology, evaluation of drug efficacy of the proposed treatment regimens.

The quality indicators of products and services can be expressed in different units. In qualimetric analysis for evaluation, we select the form of release, routes of administration, range of indications (typical for all analogues +1 point, additional +2 points), contraindications (characteristic 0 points, specific -1 point), side effect (characteristic 0 points, specific -1 point), the predominant features). Measurements of individual properties of medicinal products were calculated using the relative quality index ( $K_{ij}$ ) according to the formula:

$$K_{ij} = f(P_{ij}, P_{ij}^{bases}), \quad (1)$$

where  $P_{ij}^{bases}$  – the basic indicator of comparative quality assessments [10–12].

## Results

To conduct a survey of neurologists of public and private medical institutions of Zaporizhzhia and Dnipropetrovsk regions to assess the effectiveness of the studied drugs, a questionnaire was developed, which included the following treatment regimens: the first – drugs that restore the myelin sheath: “Mielofan” (Sintal Dietetics S.r.l., Italy), “Nucleo CMF Forte”, “Keltican” (Ferrer Internacional S.A., Spain); to the second – myelorelaxants: “Tizalud” (PJSC “Kyiv Vitamin Plant”, Ukraine), “Midokalm” (Gedeon Richter, Hungary), “Muskomed” (Mefar Ilac San. A.S., Turkey.); to the third – nonsteroidal drugs: “Ketanov” (S.C. Terapia S.A, Romania), “Dikloberl”, “Dexalgin” Berlin-Chemie, GmbH, Germany).

As can be seen from *Table 1*, the treatment regimens for radiculalgia and radiculopathy included the following drugs:

- Scheme 1 (drugs to restore the myelin sheath): “Nucleo CMF Forte” (code ATC – N07X X19\*\*), “Keltican” (code ATC – N07X X19\*\*) and biological additive “Mielofan”;
- Scheme 2 (muscle relaxants): “Muskomed” (code ATC – M03B X05), “Mydocalm” (code ATC – M03B X04) and “Tizalud” (code ATC – M03B X02);
- Scheme 3 (nonsteroidal anti-inflammatory and anti-rheumatic drugs): “Dikloberl” (code ATC – M01A B05), “Ketanov” (code ATC – M01A B15) and “Dexalgin” (code ATC – M01A E17) [6,7].

One of the components of product competitiveness on the market is its quality and product compliance with consumer requirements, which should be considered as a set of properties capable of satisfying consumer needs for their purpose [10].

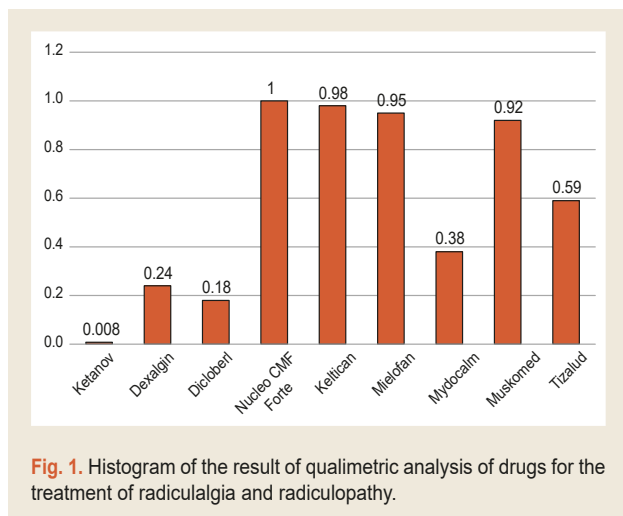


Fig. 1. Histogram of the result of qualimetric analysis of drugs for the treatment of radiculalgia and radiculopathy.

One of the solutions to the tasks of assessing the level of product quality is a comparison of various possible variants of the proposed products.

Qualimetric analysis was used to determine the (efficiency and rationality) competitiveness of drugs of this action. It shows the evaluation of the quality of medicines using a scale of points. Qualimetric characterization was performed on the basis of the generalization of data on the clinical use of drugs. The obtained results of qualimetric analysis are presented in a histogram (Fig. 1).

## Discussion

According to Table 1, when prescribing drug therapy according to scheme 1, doctors prefer “Nucleo CMF Forte” (43.2 %) and its analog “Keltican” (40.8 %). Pharmacists confirm the high efficiency and relative safety of “Nucleo CMF Forte” (71.0 %). In this case, according to the results of qualimetric analysis, all of the above drugs are quite effective and safe ( $K_{ij} = 0.98–1.00$ ) (Fig. 1). When using drugs for the treatment of pathology of the peripheral nervous system, included in scheme 2, doctors determine the effectiveness of “Mydocalm” (43.8 %) and “Muskomed” (40.2 %). Pharmacists believe that the most effective in this scheme is “Mydocalm” (71.0 %). The results of qualimetric analysis showed that only “Muskomed”, which is preferred by only 17.0 % of patients, is relatively effective and safe ( $K_{ij} = 0.92$ ). “Mydocalm” in the presence of a large number of contraindications and side effects can be attributed to a highly toxic drug ( $K_{ij} = 0.38$ ).

According to the results of qualimetric analysis, drugs included in the third scheme of treatment of radiculopathies and radiculalgia are ineffective and highly toxic. This primarily applies to “Ketanov” ( $K_{ij} = 0.08$ ). However, 56.0 % of patients use this drug, although only 18.5 % of neurologists prescribe it, preferring “Dicloberl” (42.0 %) and “Dexalgin” (39.5 %). At the same time, from the point of view of pharmaceutical workers patients prefer the latter – 19.0 % and 25.0 %, respectively, i. e. for patients, the importance of the pharmacological effect outweighs the consequences for the body from the side effects of drugs.

Table 1. Data on the preferences of physicians and pharmacists regarding drugs for the treatment of diseases of the peripheral nervous system

Medicines	Results		
	Survey of neurologists, %	Survey of pharmacists, %	Coefficient qualimetric assessment ( $K_{ij}$ )
<b>Scheme 1</b>			
“Nucleo CMF Forte”	43.2	71.0	1
“Keltican”	40.8	17.0	0.98
“Mielofan”	16.0	12.0	0.95
<b>Scheme 2</b>			
“Mydocalm”	43.8	71.0	0.38
“Muskomed”	40.2	17.0	0.92
“Tizalud”	16.0	12.0	0.59
<b>Scheme 3</b>			
“Ketanov”	18.5	56.0	0.08
“Dexalgin”	39.5	25.0	0.24
“Dicloberl”	42.0	19.0	0.18

## Conclusions

1. A study of the preferences of doctors and pharmaceutical workers regarding medicinal products for the treatment of radiculopathy and radiculalgia was conducted.

2. The preferences of doctors and pharmaceutical workers regarding the proposed treatment regimens for the specified pathologies have been established.

3. The most effective and safe drugs for the treatment of these diseases have been identified by the method of qualimetric analysis.

4. Prospects for further research are aimed at the analysis of the market of drugs for the restoration of the myelin sheath as a promising group for the treatment of pathologies of the peripheral nervous system.

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

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

### Information about authors:

Brytanova T. S., PhD, Teaching Assistant of the Department of Organic and Bioorganic Chemistry, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine. ORCID ID: [0000-0003-1805-4552](https://orcid.org/0000-0003-1805-4552)

Zarichna T. P., PhD, Associate Professor of the Department of Management and Pharmacy Economics, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0002-3711-4453](https://orcid.org/0000-0002-3711-4453)

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

ORCID ID: [0000-0001-9696-221X](https://orcid.org/0000-0001-9696-221X)

Shostak Yu. V., Medical Representative, B-pharma Ltd., Kyiv, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0002-2031-5902](https://orcid.org/0000-0002-2031-5902)

### Відомості про авторів:

Британова Т. С., канд. фарм. наук, асистент каф. органічної і біоорганічної хімії, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Зарічна Т. П., канд. фарм. наук, доцент каф. управління та економіки фармацевції, Запорізький державний медичний університет, Україна.

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

Шостак Ю. В., медичний представник, ТОВ «Бі-фарма», м. Київ, Україна.

---

## References

- [1] Svyrydova, N. K., Chuprina, H. N., Parnykoza, T. P., Sereda, V. H., & Kustkova, A. S. (2015). Radykulopatii ta korintsevi vertebroheni syndromy [Radiculopathy and radicular vertebrogenic syndromes]. *Skhidno-yevropeyskyi nevrolohichnyi zhurnal*, (2), 39-48. [in Ukrainian].
- [2] Tarulli, A. W., & Raynor, E. M. (2007). Lumbosacral radiculopathy. *Neurologic clinics*, 25(2), 387-405. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2007.01.008>
- [3] Schoenfeld, A. J., Laughlin, M., Bader, J. O., & Bono, C. M. (2012). Characterization of the incidence and risk factors for the development of lumbar radiculopathy. *Journal of spinal disorders & techniques*, 25(3), 163-167. <https://doi.org/10.1097/BSD.0b013e3182146e55>
- [4] Jordan, J., Konstantinou, K., & O'Dowd, J. (2009). Herniated lumbar disc. *BMJ clinical evidence*, 2009, 1118. <https://doi.org/10.3171/jns.1994.81.5.0806b>
- [5] Berry, J. A., Elia, C., Saini, H. S., & Miulli, D. E. (2019). A Review of Lumbar Radiculopathy, Diagnosis, and Treatment. *Cureus*, 11(10), e5934. <https://doi.org/10.7759/cureus.5934>
- [6] Kovalenko O. Ye., Macheret Ye. L., Halusha A. I. (2011). Viddaleni nevrolohichni naslidky lehkykh vertebralnykh travm [Long-term neurological consequences of mild vertebral injuries]. *Zdorovia Ukrainy*, (2), 9-11. [in Ukrainian].
- [7] Gotsulya, A. S., Pruglo, Ye. S., Panasenko, O. I., & Knysh, Ye. G. (2014). Protyzapalna aktyvnist solei 2-(5-((teofilin-7-il)metyl)-4-R-4N-1,2,4-triazol-3-iltio)atsetatnoi kysloty [Anti-inflammatory activity of 2-(5-((theophylline-7'-yl)methyl)-4-R-4H-1,2,4-triazole-3-ylthio)acetic acid salts]. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*, (3), 60-62. [in Ukrainian].
- [8] *Kompendium – Likarski zasoby* [Compendium – Drugs]. [in Ukrainian]. <http://compendium.com.ua/>
- [9] Ministry of Health of Ukraine. (n.d.). *Derzhavnyi reiestr likarskykh zasobiv Ukrainy* [State register of medicines of Ukraine]. <http://www.drz.kiev.ua>
- [10] Dmytrenko, H. A., Anufrieva, O. L., Burlaienko, T. I., & Medvid, V. V. (2016). *Kvalimetriia v upravlinni: humanistychnyi kontekst* [Qualimetrics in management: a humanistic context]. Kyiv: Vydavnytstvo «Ahrna osvita». [in Ukrainian].
- [11] Kuts, V. R., Stoliarchuk, P. H., & Druziuk, V. M. (2012). *Kvalimetriia* [Qualimetrics]. Lviv: Vydavnytstvo Natsionalnoho universytetu «Lvivska politehnika». [in Ukrainian].
- [12] Posylkina, O. V., & Demchenko, N. V. (2014). Metodolohichni i metodychni aspekty otsinky konkurentospromozhnosti farmatsevychnykh pidpriemstv [Methodological and methodical aspects of pharmaceutical companies competitiveness assessment]. *Upravlinnia, ekonomika ta zabezpechennia yakosti v farmatsii*, (2), 28-35. [in Ukrainian].



# Дослідження сучасного стану ринку вітамінно-мінеральних комплексів для вагітних та інформаційного супроводу жінок у період вагітності

В. О. Демченко<sup>ID</sup>\*A,C,F, Н. О. Ткаченко<sup>ID</sup>A,B,D,F, В. О. Демченко<sup>ID</sup>C,E

Запорізький державний медичний 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

**Мета роботи** – вивчення вітчизняного ринку вітамінно-мінеральних комплексів для вагітних (ВМКВ) та укладання інформаційного масиву для ухвалення раціональних рішень щодо формування аптечного асортименту цієї групи товарів та інформаційного супроводу жінок у період вагітності.

**Матеріали та методи.** Як матеріал для дослідження використовували Державний реєстр лікарських засобів України, довідник лікарських засобів Компендіум онлайн, інтернет-ресурси з пошуку ліків в аптеках України GeoApteka та Tabletki.ua, інтернет-ресурси мережевих аптек, оптові пропозиції ВМКВ для аптек згідно з програмним комплексом «Аптека». Під час роботи застосували маркетингові методи, методи моніторингу, логічного узагальнення, групування та графічний.

**Результати.** На підставі аналізу інформаційних джерел про ВМКВ сформували дві асортиментні групи: 99 % сегмента представлено спеціальними харчовими продуктами, 1 % – лікарськими засобами. Вивчили фірмову структуру ринку, а також проаналізували соціально-економічну доступність ВМКВ для споживача – вагітної жінки.

**Висновки.** На українському фармацевтичному ринку ВМКВ переважають ґенеричні багатокомпонентні препарати іноземного виробництва, що мають середню доступність для споживача. Така ситуація створює передумови для розвитку власного виробництва ВМКВ належної якості, що сприятиме підвищенню їхньої доступності та зменшить економічне навантаження на споживача – вагітну жінку. Інформаційне забезпечення жінок до початку планування вагітності та у період виношування дитини відповідає задовільному рівню. Передусім це пов'язано з необхідністю обов'язкового звернення жінки до лікаря у період планування вагітності та постійного контролю під час вагітності. З іншого боку, фармацевтична опіка не в змозі компенсувати брак інформації щодо ВМКВ через особливості стану жінки, а саме вагітність, що потребує нагляду та контролю лікаря.

**Ключові слова:** вітамінно-мінеральні комплекси для вагітних, маркетингові дослідження, соціально-економічна доступність, інформаційний супровід вагітних.

**Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2022. Т. 15, № 3(40). С. 330–336**

## Research of the current state of the market of vitamin and mineral complexes for pregnant women and information support for women during pregnancy

V. O. Demchenko, N. O. Tkachenko, V. O. Demchenko

**Aim of the work** is to study of the domestic market of vitamin and mineral complexes for pregnant women with the subsequent formation of an information array for making rational decisions on the formation of the pharmacy range of this group of products and information support for women during pregnancy.

**Materials and methods.** The State Register of Medicinal Products of Ukraine, the Compendium Online Directory of Medicinal Products, Internet resources on drug search in Ukrainian pharmacies GeoApteka and Tabletki.ua, Internet resources of online pharmacies, wholesale offers of vitamin and mineral complexes for pregnant women for pharmacies according to the "Apteka" software package were used as research material. The marketing method, monitoring methods, logical generalization, grouping, and graphic were used in the work.

**Results.** Based on the analysis of information sources about vitamin and mineral complexes for pregnant women, two assortment groups were formed: 99 % of the segment is represented by special food products and 1 % – by medicines. We studied the corporate structure of the market, as well as analyzed the socio-economic accessibility for consumers – pregnant women.

### ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/259188>

UDC 339.13:615.356-055.26

DOI: [10.14739/2409-2932.2022.3.259188](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2022.3.259188)

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 330–336

**Key words:** vitamin and mineral complexes for pregnant women, marketing research, social and economic accessibility, information support for pregnant women.

\*E-mail: [victoriya@ukr.net](mailto:victoriya@ukr.net)

Received: 22.02.2022 // Revised: 10.03.2022 // Accepted: 22.03.2022



**Conclusions.** The Ukrainian pharmaceutical market of vitamin and mineral complexes for pregnant women is dominated by generic multicomponent drugs of foreign production, which have medium availability for the consumer. This situation creates the preconditions for the development of own production of proper quality, which will increase their availability and reduce the economic burden on the consumer – a pregnant woman. The information support of women before the beginning of pregnancy planning and during childbirth is in satisfactory condition. This is primarily due to the need for a woman to see a doctor during pregnancy planning and constant monitoring during pregnancy. On the other hand, pharmaceutical care is not able to compensate for the lack of information on vitamin and mineral complexes for pregnant women due to the peculiarity of the woman's condition – pregnancy, which requires medical supervision.

**Key words:** vitamin and mineral complexes for pregnant women, marketing research, social and economic accessibility, information support for pregnant women.

**Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (3), 330–336**

Збереження здоров'я жінки залишається одним зі стратегічних завдань кожної держави, оскільки жінка відіграє важливу роль у формуванні трудового потенціалу країни – безпосередньо особисто та опосередковано, шляхом народження дітей. За даними світової та вітчизняної статистики, серед головних проблем фертильності поряд із безпліддям, смертністю та інфекціями, що передаються статевим шляхом, залишаються проблеми з вагітністю: невиношування та ускладнення [1]. Саме тому організація якісної підтримки здоров'я жінки під час вагітності – важлива фармацевтична та медико-соціальна проблема.

За останні десятиліття наукова спільнота досягла суттєвих успіхів у дослідженні питань, пов'язаних зі збереженням фертильності, встановивши чіткий взаємозв'язок між харчуванням матері та здатністю до народження дитини [2,3]. Дотримання здорового харчування, насиченого морепродуктами, білком м'яса птиці, цільнозерновими продуктами, фруктами й овочами, покращує фертильну функцію жінки й поліпшує перебіг виношування дитини. Проте навіть при збалансованому харчуванні й адекватних енерговитратах організм вагітної не в змозі забезпечити всі потреби, що збільшуються у цей важливий для жінки період. Саме вітаміни та мінерали створюють сприятливі умови для адекватної зміни розмірів, функціональної активності органів і систем матері під час виношування та розвитку плода. Протягом вагітності потреба у вітамінах і мінеральних речовинах збільшується в 2–4 рази; посилюють потребу в них і несприятливі екологічні умови, хронічні захворювання, захворювання печінки та шлунка, стреси [4,5].

Серед головних наслідків гіпо-, авітамінозів і дизмікроелементозів (ДМЕ) вагітних найчастіше визначають анемії (можна розглядати як окремий патологічний стан і як наслідок авітамінозу, ДМЕ – дефіцит заліза, фолієвої кислоти та ціанокобаламіну), подовження пологової діяльності та спонтанні аборти (дефіцит цинку), соматичні відхилення (дефіцит магнію та йоду) тощо. Такі серйозні наслідки порушення вітамінно-мінерального статусу в жінок під час вагітності спричиняють необхідність додаткового приймання різних комплексів вітамінів і мінералів.

Арсенал засобів для лікування й профілактики названих патологічних станів у вагітних доволі великий, складається з лікарських засобів (ЛЗ) і спеціальних харчових продуктів (СХП). Останніми роками спостерігають «перехід» деяких фармацевтичних товарів із категорії ЛЗ у категорію СХП, що знижує якість лікувального процесу

та рівень безпеки для споживача [6,7]. Не виняток у цьому питанні – сегмент вітамінно-мінеральних комплексів для вагітних (ВМКВ), що обґрунтовує актуальність здійснених досліджень з акцентом уваги на їхній доступності під час воєнної агресії росії проти України та погіршенні соціально-економічного стану в країні.

Питання щодо доступності ЛЗ різних нозологій, зокрема вітамінів, висвітлено в наукових працях І. Я. Городецької [8], Б. П. Громова [9], А. А. Котвіцької [10], А. С. Немченко [11], Н. О. Ткаченко [12] тощо. Втім, сегмент ринку ВМКВ залишається без належної уваги.

## Мета роботи

Вивчення вітчизняного ринку ВМКВ та укладання інформаційного масиву для ухвалення раціональних рішень щодо формування аптечного асортименту цієї групи товарів та інформаційного супроводу жінок у період вагітності.

## Матеріали і методи дослідження

Як матеріал для дослідження використали Державний реєстр лікарських засобів України, довідник лікарських засобів Компендіум онлайн [13], інтернет-ресурси з пошуку ліків в аптеках України GeoApteka та Tabletki.ua, інтернет-ресурси мережевих аптек «АНЦ», «Копійка», «Шар@», «Аптека 911», «Мед-сервіс», гуртові пропозиції ЛЗ для аптек згідно з програмним комплексом «Аптека».

Під час роботи застосували маркетингові методи, методи моніторингу, логічного узагальнення, групування та графічний.

## Результати

На першому етапі досліджень здійснили комплексний структурований аналіз сучасного арсеналу комбінованих засобів, які лікарі використовують для профілактики та лікування гіпо-, авітамінозів, ДМЕ, зокрема анемії у вагітних.

Станом на 01.02.2022 р. виявили 34 ВМКВ, з-поміж яких лише 2 комплекси, що зареєстровані як ЛЗ (табл. 1).

Під час наступного дослідження для оцінювання економічної доступності ВМКВ (для постійних ринкових позицій) розраховали коефіцієнт адекватності платоспроможності ( $K_{a.s.}$ ) та коефіцієнт доступності ( $K_d$ ) (табл. 2).

Таблиця 1. Асортиментна структура сегмента ВМКВ

№	Торгова назва	Фірма-виробник, країна	Форма випуску
<b>Лікарські засоби</b>			
1	Елевіт® пронаталь	Роттендорф Фарма ГмБХ, Німеччина	Таблетки № 30 (10 × 3), № 100 (20 × 5)
2	Вітрум® пренатал	Юніфарм, Інк., США	Таблетки № 15, 30, 60, 100
<b>Спеціальні харчові продукти (дієтичні добавки)</b>			
1	Аллігат	Novator Pharma, Лондон, Велика Британія	капсули № 30 (15 × 2)
2	Алфавіт мама	ПАТ «Вітаміни», Україна	таблетки № 60
3	Бембі Джениус Пренаталь з Омега-3	Softgel Healthcare, Індія	капсули м'які желатинові № 30
4	Велнаталь	Exeltis Healthcare, Італія	таблетки № 30
5	Вітаген прегнакеа	Biodeal Pharmaceuticals Private Limited, Індія	таблетки № 60
6	Вітаген прегнаджен форте	Biodeal Pharmaceuticals Private Limited, Індія	таблетки № 60
7	Вітаджен № 27 Pregna methylfolate	Euro Lifecare Ltd., Велика Британія	таблетки № 60
8	Віта Тон Прегненсі Дуо	Newtone Pharma Limited, Велика Британія	капсули № 30, № 60
9	Вітрум Пренатал Плюс	Unipharm, Inc., США	таблетки, в/плів. обол. № 30
10	Доппельгерц актив (фолієва кислота + В6 + В12 + С +Е)	Квайссер Фарма ГмБХ і Ко. КГ, Німеччина	таблетки № 30 (10 × 3)
11	Доппельгерц актив, вітаміни для мами		
12	Ембрія ФОЛ	Фармаком, Україна	таблетки по 0,1 г № 150
13	Емфетал	«Кенди Фарма», Банкья, Болгарія	таблетки по 850 мг № 60
14	Ера 400	Gricar Chemical S.r.l., Італія	капсули № 30
15	Інофолік софтгель	(Exeltis Healthcare, Італія)	таблетки № 30
16	Комбіфол	Sante Naturelle, Канада	таблетки, № 60
17	Магнокс Прегна	Наве Фарма, Ізраїль	капсули № 30
18	Натабіол вітаміни для вагітних	Med-Eq AS, Норвегія	таблетки № 30
19	НутріМамма	ТОВ «Нутріміл», Індія	капсули м'які желатинові № 30
20	Ожестан	Капсужель Плоермель / Лафаль Ендюстрі, Франція	капсули № 30
21	Прегна-5	Amaha Pharma Велика Британія	капсули м'які № 30
22	Прегнакеа Оріджинал	Delta Medical Promotions AG, Швейцарія	капсули № 30
23	ПреМама Дуо комбі	EUROPHARMA ALLIANCE SP. Z.O.O., Польща	Комбі-упаковка № 60 (таблетки № 30 + капсули № 30)
24	Свісс Енерджі Пренатал Мультивіт	FORTEX NUTRACEUTICALS LTD, Болгарія	капсули № 30
25	Solgar Солгар Пренатабс	Solgar, США	таблетки № 60
26	Сумавіт матерна	mibe GmbH Artsnaimittel, Німеччина	капсули № 30
27	Фолівіт	ТОВ «Юніверс Фарм», Україна	капсули желат. з пораш. № 60
28	Фолівіт 2		
29	Фольтреса	Абела Фарм, Сербія	капсули № 30
30	Фемібіон Наталкер I	Мерк КгаА енд КоВерк Шпитталь, Німеччина	таблетки № 30
31	Фемібіон Наталкер II Комбі	Мерк КгаА енд КоВерк Шпитталь, Німеччина	капсули № 60
32	Ферродін	Metagenics Ink, США	капсули № 30

## Обговорення

Аналіз ВМКВ за критерієм «лікарська форма» показав, що в асортименті переважають таблетовані форми – 50 %, на капсули припадає 38 %, а частка м'яких капсул на ринку становить 12 %.

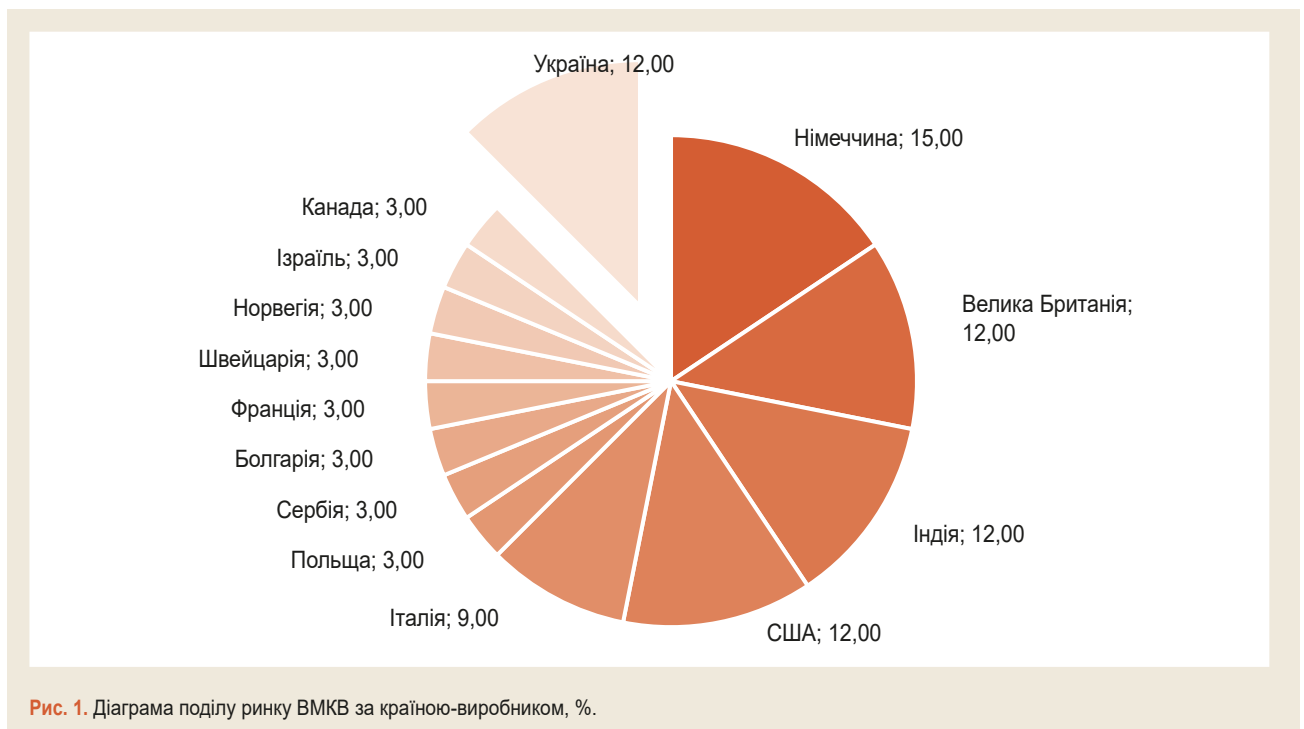
За критерієм порядок відпуску з аптеки визначили: усі засоби відпускаються без рецепта лікаря.

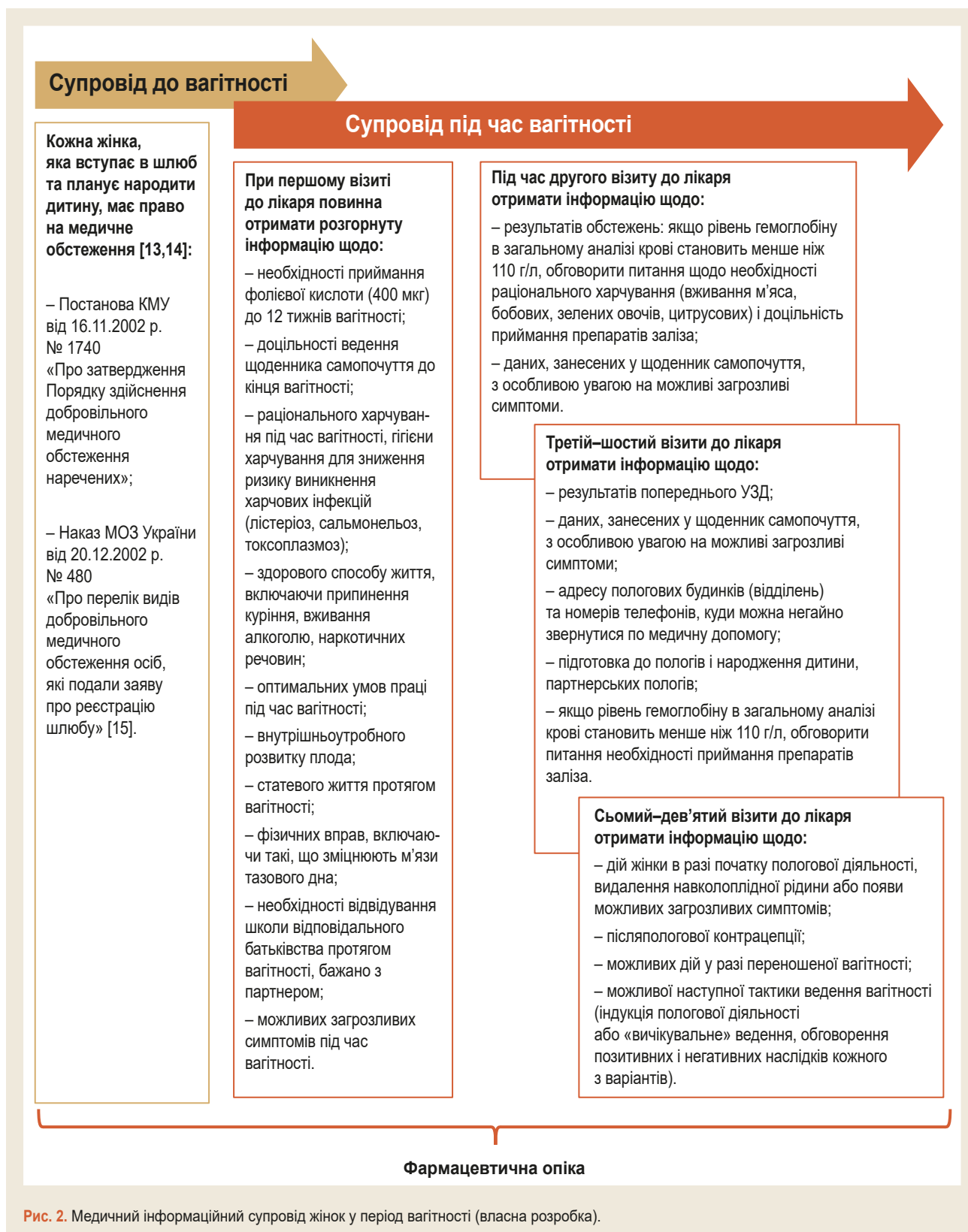
Щодо фірмової структури ринку ВМКВ, то в результаті аналізу встановили, що нині 88 % продукції представлено іноземними виробниками (рис. 1). Лідирує Німеччина (Квайссер Фарма ГмБХ і Ко. КГ, Мерк КгаА енд КоВерк Шпитталь) – 14,7 % ринку. Великій Британії, Індії, США та Україні належить по 12 %, Італії – 9 %. Найменша кількість ВМКВ представлена виробника-

Таблиця 2. Показники цінової доступності ВМКМ на 01.02.2022 року

№	Торгова назва	Середньозважена роздрібна ціна, грн.	$K_{з.с}$	$K_d$
1	Елевіт® пронаталь (№ 30)	400,0	0,03	0,97
2	Аллігат (№ 30)	311,60	0,02	0,98
3	Алфавіт мама (№ 60)	200,4	0,01	0,99
4	Бєбі Джєніус Прєнаталь з Омєга-3 (№ 30)	257,9	0,02	0,98
5	ВітаТон Прєгнєнсі Дуо (№ 30)	320,4	0,02	0,98
6	Вітрум Прєнатал Плюс (№ 30)	170,1	0,01	0,99
7	Доппєльгєрц актив (фолієва кислота + В6 + В12 + С +Е (№ 30)	153,4	0,01	0,99
8	Доппєльгєрц актив, вітаміни для мами (№ 30)	174,8	0,01	0,99
9	Ємфєтал (№ 60)	224,7	0,02	0,98
10	Єра 400 (№ 30)	230,4	0,02	0,98
11	Комбіфол (№ 30)	265,1	0,02	0,98
12	Магнокс Прєгна (№ 30)	335,1	0,02	0,98
13	НутріМама (№ 30)	530,1	0,04	0,96
14	ПрєМама Дуо комбі (№ 60)	548,1	0,04	0,96
15	Прєгна-5 (№ 30)	490,1	0,04	0,96
16	Свісс Єнерджі Прєнатал Мультивіт (№ 30)	287,1	0,02	0,98
17	Солгар Прєнатабс (№ 60)	380,6	0,03	0,97
18	Фолівіт (№ 30)	330,0	0,02	0,98
19	Фолівіт 2 (№ 60)	510,0	0,04	0,96
20	Фольтрєса (№ 30)	161,5	0,01	0,99
21	Фємібіон Наталкер ІІ комбі (№ 60)	543,1	0,04	0,96
22	Фємібіон Наталкер І	334,1	0,02	0,98

Середньомісячна заробітна плата середньостатистичного мешканця Запорізького регіону впродовж 2021 року становила 13 612 грн (джерело: <https://index.minfin.com.ua/labour/salary/average/2022/>).





ми із Сербії, Польщі, Болгарії, Норвегії та Франції – по 3 %.

Розраховані показники  $K_{a.s.}$  свідчать, що більш доступними для вагітних жінок є СХП (дієтичні добавки): Алфавіт мама № 60 (0,01), Доппельгерц актив № 30

(0,01), Доппельгерц актив вітаміни для мами № 30 (0,01), Фольграса № 30 (0,01) та Вітрум Пренатал Плюс № 30 (0,01), оскільки між коефіцієнтом адекватності платоспроможності та поняттям доступності за цінами є обернено пропорційний зв'язок. Це підтверджує розрахований  $K_d$ ,

який для названих комплексів становить 0,99. Найменша доступність характерна для ВМКВ НутріМама № 30 та Прегна-5 № 30 – 0,96. Такий самий показник доступності (0,96) визначили для ПреМама Дуо комбі, Фолівіт 2 та Фемібіон Наталкер II комбі, однак кількість доз в упаковці вдвічі більша (№ 60), що пролонгує термін приймання на 2 місяці, а отже підвищує доступність цих ВМКВ.

На жаль, ВМКВ як ЛЗ (Елевіт® пронаталь № 30 –  $K_d = 0,97$ ) для вагітних жінок є менш доступними, ніж СХП. Вітрум® пренатал на період воєнного стану взагалі відсутній в аптеках.

Наступний етап дослідження – вивчення рівня інформаційного забезпечення вагітних жінок з питань профілактики та лікування авітамінозів і ДМЕ під час медичного супроводу (на прикладі Запорізької області).

Процеси виношування дитини пов'язані зі зміною фізіологічного та психічного стану вагітної, що може становити ризики для здоров'я жінки та майбутньої дитини. Саме тому жінка має право на якісне інформаційне забезпечення під час медичного супроводу вагітності (рис. 2).

Медичний інформаційний супровід охоплює всі рівні допомоги: первинну медичну допомогу; екстрену медичну допомогу, в тому числі стоматологічну; вторинну (спеціалізовану) медичну допомогу за направленням; третинну (високоспеціалізовану) медичну допомогу за направленням; медичну допомогу дітям, вагітним і породіллям. Для надання спеціалізованої медичної допомоги вагітним у Запорізькій області протягом 2021 року функціонували КНП «Обласний перинатальний центр» ЗОР, 4 пологових будинки, 25 жіночих консультаційних, 24 акушерсько-гінекологічних і 23 оглядових кабінети.

Основою для фармацевтичних фахівців (ФФ) щодо фармацевтичної опіки є протоколи фармацевта, тобто медико-технологічні документи, що мають на меті оптимізацію фармацевтичного обслуговування пацієнтів у випадках самостійного розпізнавання ними симптомів захворювання при відповідальному самолікуванні [14].

Вивчення протоколів фармацевта (наказ МОЗ України від 05.01.2022 р. № 7) показав, що нині немає протоколів щодо лікування та профілактики гіпо- та авітамінозів, ДМЕ, у тому числі анемії у вагітних.

Враховуючи особливості стану жінки в період вагітності, а також наслідки нераціонального вживання ЛЗ і СХП (самолікування) у період виношування дитини, ФФ має право рекомендувати препарати та надавати інформацію щодо профілактики та лікування цих патологічних станів, тільки спираючись на рекомендації сімейного лікаря. Крім того, жінка може ознайомитися з інструкцією до застосування ВМКВ і листком-вкладкою.

Аналіз інструкцій для медичного застосування ЛЗ і листків-вкладок до упаковки СПХ показав, що інформацію надано зрозуміло, чітко прописано час і дози застосування. ВМКВ зручні до застосування (1 таблетка/капсула на добу), приймання препаратів здебільшого не залежить від часу та періоду доби. Для таких засобів, як «Магнокс Прегна», «Фолівіт» і «Фолівіт II» чітко наведено особливі умови застосування з роз'ясненнями

для споживачів, а саме вагітних: «Магнокс Прегна» треба вживати перед сном (містить більшу кількість магнію, що може спричинити сонливість), а «Фолівіт I, II» приймають вранці.

## Висновки

1. Дослідження, що здійснили, дали змогу вивчити структуру ринку ВМКВ: 99 % цього сегмента представлено СХП, 1 % – ЛЗ. Переважають генеричні багатоконпонентні препарати іноземного виробництва, що мають середню доступність для споживача. Така ситуація створює передумови для розвитку власного виробництва ВМКВ належної якості, що сприятиме підвищенню їхньої доступності та зменшить економічне навантаження на споживача – вагітну жінку.

2. Інформаційне забезпечення жінок до початку планування вагітності та у період виношування дитини відповідає задовільному рівню. Передусім це пов'язано з необхідністю обов'язкового звернення жінки до лікаря у період планування вагітності (окремі вітаміни та мінерали потрібно приймати за 3–6 місяців до вагітності) та постійного контролю під час вагітності. Ця відповідальність покладається на жінку як свідому особу, що не завжди збігається з реаліями сьогодення (незапланована/небажана вагітність, брак часу в матері, несвоєчасна постановка на облік). З іншого боку, фармацевтична опіка не в змозі компенсувати брак інформації щодо ВМКВ через особливість стану жінки, а саме вагітність, що потребує нагляду та контролю лікаря.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

**Conflicts of interest:** authors have no conflict of interest.

## Подяка

Автори вдячні Збройним Силам України за можливість працювати і публікуватися.

## Відомості про авторів:

Демченко В. О., канд. фарм. наук, доцент каф. управління та економіки фармацевтичної, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0001-9117-0467](https://orcid.org/0000-0001-9117-0467)

Ткаченко Н. О., д-р фарм. наук, доцент, зав. каф. управління та економіки фармацевтичної, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0002-8566-5938](https://orcid.org/0000-0002-8566-5938)

Демченко В. О., канд. фарм. наук, асистент каф. управління та економіки фармацевтичної, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0001-5142-6296](https://orcid.org/0000-0001-5142-6296)

## Information about authors:

Demchenko V. O., PhD, Associate Professor of the Department of Management and Pharmacy Economics, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Tkachenko N. O., Dr.hab., Associate Professor, Head of the Department of Management and Pharmacy Economics, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Demchenko V. O., PhD, Assistant of the Department of Management and Pharmacy Economics, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

## Список літератури

- [1] Що варто знати про репродуктивне здоров'я // *Центр громадського здоров'я МОЗ України*. 2020. URL : <https://phc.org.ua/news/scho-var-to-znati-pro-reproduktivne-zdorovya>
- [2] Gaskins A. J., Chavarro J. E. Diet and fertility: a review. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2018. Vol. 218, Iss. 4. P. 379-389. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.08.010>
- [3] Bhutta Z. A., Salam, R. A. Global nutrition epidemiology and trends. *Annals of nutrition & metabolism*. 2012. Vol. 61, Suppl. 1. P. 19-27. <https://doi.org/10.1159/000345167>
- [4] Socioeconomic, Lifestyle and Dietary Factors Associated with Dietary Supplement Use during Pregnancy / C. Pouchieu, R. Lévy, C. Faure et al. *PLoS ONE*. 2013. Vol. 8, Iss. 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070733>
- [5] *Акушерство та гінекологія*: у 4 т. / за ред. В. М. Запорожана. Київ : Медицина, 2013. Т. 1-2. 543 с.
- [6] Чухрай І. Л., Дацко А. Й. Пробиотики в контексті фармацевтичної безпеки. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів* : матеріали VI наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 10-11 лист., 2016. Тернопіль : ТДМУ «Укрмедкнига», 2016. С. 292-293.
- [7] Сур С. Дике поле... Аптечний сегмент дієтичних добавок та косметичних продуктів. *Аптека online.ua*. 2022. URL : <https://www.apteka.ua/article/627032>
- [8] Левицька О. Р., Громовик Б. П. Аналіз цін і економічної доступності лікарських засобів для хворих з ішемічним інсультом. *Одеський медичний журнал*. 2013. № 3. С. 18-22.
- [9] Городецька І. Я., Блавацька О. Б. Дослідження сучасного стану ринку вітамінних засобів в Україні. *Фармацевтичний журнал*. 2019, Т. 74, № 5. С. 3-11. <https://doi.org/10.32352/0367-3057.5.19.01>
- [10] Котвіцька А. А., Прокопенко О. С. Моніторинг показників фізичної та соціально-економічної доступності лікарських засобів, які застосовуються у лікуванні хвороби Паркінсона. *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації*. 2019. № 3. С. 55-63. <https://doi.org/10.24959/uekj.19.15>
- [11] Назаркіна В. М., Немченко А. С. Міжнародний досвід управління прайсингом як основа цінової доступності лікарських засобів. *Соціальна фармація в охороні здоров'я*. 2017, Т. 3, № 2. С. 24-33. <https://doi.org/10.24959/sphhcj.17.83>
- [12] Маганова Т. В., Ткаченко Н. О. Аналіз ринку протизаплідних лікарських засобів у контексті фармацевтичної безпеки. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2020, Т. 13, № 1. С. 128-136. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2020.1.198187>
- [13] Дієтичні добавки // *Компендіум – лікарські препарати*. URL : <https://compendium.com.ua/uk/#bad>
- [14] Про затвердження Порядку здійснення добровільного медичного обстеження наречених. Постанова Кабінету Міністрів України від 16.11.2002 р. № 1740. URL : <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/1740-2002-%D0%BF#Text>
- [15] Про перелік видів добровільного медичного обстеження осіб, які подали заяву про реєстрацію шлюбу. Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 20.12.2002 р. № 480. URL : <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0044-03#Text>
- the 6th scientific-practical conference (pp. 292-293). Ternopil: TDMU "Ukrmedknyha" [in Ukrainian].
- [7] Sur, S. (2022). Dyke pole... Aptechnyi sehment diietychnykh dobavok ta kosmetychnykh produktiv [Wild field... Pharmacy segment of dietary supplements and cosmetics]. *Apteka online. ua*. [in Ukrainian]. <https://www.apteka.ua/article/627032>
- [8] Levytska, O. R., & Hromovyk, B. P. (2013). Analiz tsin i ekonomichnoi dostupnosti likarskykh zasobiv dlia khvorykh z ishemichnym insultom [Price monitoring and economic drug accessibility for patients with ischemic stroke]. *Odeskyi medychnyi zhurnal*, (3), 18-22. [in Ukrainian].
- [9] Horodetska, I. Y., & Blavatska, O. B. (2019). Doslidzhennia suchasnoho stanu rynku vitaminnykh zasobiv v Ukraini [Research of the current state of the vitaminary preparations market in Ukraine]. *Farmatsevtichnyi zhurnal*, 74(5), 3-11. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.32352/0367-3057.5.19.01>
- [10] Kotvitska, A. A., & Prokopenko, O. S. (2019). Monitoryng pokaznykiv fizychnoi ta sotsialno-ekonomichnoi dostupnosti likarskykh zasobiv, yaki zastosovuiutsia u likuvanni khvoroby Parkinsona [Monitoring of indicators of physical and socio-economic availability of medicines used for Parkinson's disease treatment]. *Upravlinnia, ekonomika ta zabezpechennia yakosti v farmatsii*, (3), 55-63. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.24959/uekj.19.15>
- [11] Nazarkina, V. M., & Nemchenko, A. S. (2017). Mizhnarodnyi dosvid upravlinnia praisynhom yak osnova tsinovoї dostupnosti likarskykh zasobiv [International experience in price management as a basis for the affordability of medicines]. *Sotsialna farmatsiia v okhoroni zdorovia*, 3(2), 24-33. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.24959/sphhcj.17.83>
- [12] Mahanova, T. V., & Tkachenko, N. O. (2020). Analiz rynku protizaplidnykh likarskykh zasobiv u konteksti farmatsevtichnoi bezpeky [Analysis of contraceptive drugs market in the context of pharmaceutical safety]. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*, 13(1), 128-136. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2020.1.198187>
- [13] Compendium (n.d.). *Diietychni dobavky* [Dietary supplements]. <https://compendium.com.ua/uk/#bad>
- [14] Ministry of Health of Ukraine. (2002, November 16). *Pro zatverdzhennia Poriadku zdiisnennia dobrovolinoho medychnoho obstezhennia narechenykh*. Postanova Kabinetu Ministriv Ukrainy vid 16.11.2002 r. No. 1740 [About the statement of the Procedure for carrying out voluntary medical examination of brides (No. 1740)]. <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/1740-2002-%D0%BF#Text>
- [15] Ministry of Health of Ukraine. (2002, December 20). *Pro perelik vydiv dobrovolinoho medychnoho obstezhennia osob, yaki podaly zaiavu pro reiestratsiiu shliubu*. Nakaz Ministerstva okhorony zdorovia Ukrainy vid 20.12.2002 r. No. 480 [About the list of types of voluntary medical examination of the persons who have submitted the application for registration of marriage (No. 480)]. <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0044-03#Text>

## References

- [1] Public Health Center of the Ministry of Health of Ukraine. (2020, January 8). *Shcho varto znaty pro reproduktivne zdorovia* [What you should know about reproductive health]. <https://phc.org.ua/news/scho-var-to-znati-pro-reproduktivne-zdorovya>
- [2] Gaskins, A. J., & Chavarro, J. E. (2018). Diet and fertility: a review. *American journal of obstetrics and gynecology*, 218(4), 379-389. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.08.010>
- [3] Bhutta, Z. A., & Salam, R. A. (2012). Global nutrition epidemiology and trends. *Annals of nutrition & metabolism*, 61 Suppl 1, 19-27. <https://doi.org/10.1159/000345167>
- [4] Pouchieu, C., Lévy, R., Faure, C., Andreeva, V. A., Galan, P., Hercberg, S., & Touvier, M. (2013). Socioeconomic, Lifestyle and Dietary Factors Associated with Dietary Supplement Use during Pregnancy. *PLoS ONE*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070733>
- [5] Zaporozhan, V. M. (Ed.). (2013). *Akusherstvo ta hinekologhiia* [Obstetrics and gynecology (Vol. 1-2)]. Kyiv: Medytsyna [in Ukrainian].
- [6] Chukhrai I. L., & Datsko A. Y. (2016). Probiotyky v konteksti farmatsevtichnoi bezpeky. [Probiotics in the context of pharmaceutical safety]. *Naukovo-tekhnichniy prohres i optymizatsiia tekhnolohichnykh protsesiv stvorennia likarskykh preparativ*. Proceedings of