

А. Я. Коваль¹, С. Ю. Штриголь², Р. Б. Лесик¹, Д. В. Литкін², І. О. Лебединець², Т. К. Юдкевич²
¹ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО
²НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

ФРИГОПРОТЕКТОРНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОХІДНИХ 5,7-ДІАЦИЛ-3-Н(АЛКІЛ)-6-АРИЛ-5Н-[1,2,4]ТРІАЗОЛО[3,4-*b*][1,3,4] ТІАДІАЗИНУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Вступ. Значна поширеність холодових уражень, недостатня ефективність запобігання та лікування гострої холодової травми зумовлюють актуальність пошуку нових фригопротекторів, з-поміж яких значну роль відіграють протизапальні засоби. За попередніми даними, високу протизапальну активність проявляють представники нового класу сполук – похідних 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину, що може бути предиктором фригопротекторної активності.

Мета дослідження – виконати скринінг низки найактивніших сполук на фригопротекторні властивості на моделі гострого загального охолодження (ГЗО) та поглиблено дослідити сполуку-лідера за критеріями впливу на температуру тіла, стан системи гемостазу, низку показників запального каскаду та NO-синтазу.

Методи дослідження. Експерименти виконано на білих нелінійних мишах та щурах-самцях. Для скринінгу на фригопротекторну активність на мишах взято три похідні 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину (лабораторні шифри: IFT-180, IFT-247, IFT-251). Сполуки в дозі 25 мг/кг та препарат порівняння диклофенак натрію (14 мг/кг) вводили внутрішньошлунково за 60 хв до холодової експозиції тварин при -18 °С. Визначали час життя мишей. У поглибленому дослідженні на моделі ГЗО (експозиція 2 год при -18 °С) з'ясовували вплив сполуки-лідера (IFT-247) в дозі 18 мг/кг та препарату порівняння диклофенаку натрію (7 мг/кг) на ректальну температуру щурів. У найгостріший період холодової травми визначали вплив зазначеної сполуки на показники системи гемостазу. В печінці визначали вміст низки маркерів запалення з використанням видоспецифічних наборів.

Результати й обговорення. За результатами скринінгу трьох похідних 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину, фригопротекторна активність не є загальною ознакою сполук цього ряду. Досліджено, що потужні фригопротекторні властивості на рівні препарату порівняння диклофенаку натрію проявляє лише сполука IFT-247, яка статистично значуще збільшує час життя мишей із моделлю ГЗО на рівні диклофенаку натрію. У щурів сполука IFT-247 зменшує ступінь гіпотермії за двогодинної експозиції при -18 °С (15 мг/кг), не поступаючись референс-препарату. В найгостріший період холодової травми в щурів досліджувана сполука запобігає розвитку ДВЗ-синдрому і тромбозу, знижуючи вміст D-димеру та фібриногену в сироватці крові й нормалізуючи підвищений тромбіновий час на рівні диклофенаку натрію. Сполука IFT-247 при ГЗО пригнічує розвиток системної запальної реакції: попереджує збільшення вмісту лейкотриєну В4 і тотальних лейкотриєнів, поступаючись за цією властивістю диклофенаку натрію; подібно до референс-препарату значно зменшує до субнормального рівня вміст IL-1 β та до нормального – TNF- α без впливу на IL-6 і на зменшений вміст протизапальних цитокінів – IL-4 й IL-10, нормалізує збільшене співвідношення про- та протизапальних цитокінів.

Висновки. Встановлено, що (1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон) проявляє властивості перспективного фригопротектора, що потребує подальшого дослідження.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: холодова травма; експеримент; похідні 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину; температура тіла; система гемостазу; маркери запалення.

ВСТУП. Гостра холодова травма (ХТ) донедавна залишається актуальною медичною та соціальною проблемою [1, 2]. Вона трапляється в різних кліматичних поясах, зокрема в теплому кліматі [3], супроводжується досить високою летальністю – до 8,6 смертельного випадку на 100 000 населення, здебільшого в старшому віці

© А. Я. Коваль, С. Ю. Штриголь, Р. Б. Лесик, Д. В. Литкін, І. О. Лебединець, Т. К. Юдкевич, 2024.

[4]. Особливо часто ХТ виникає у військових (у США в 2019 р. 36,5 випадку на 100 000 військових) [5], представників екстремальних видів спорту (36,6 % альпіністів, 20,0 % лижників) [6], безхатченків тощо. Гостра ХТ актуальна для сучасної України [7]: ще до початку повномасштабної російської агресії по медичну допомогу лише протягом 4 тижнів (грудень 2018 р. – січень 2019 р.) звернулось 1037 осіб із ХТ, з яких 92 %

було ушпиталено [8]. Під час бойових дій у холодну пору року, особливо за умов підвищеної вологості, ризик отримання ХТ збільшується.

Лікування ХТ донині є складним завданням. Набувають розвитку фригопротекторні засоби – збірні групи препаратів, що чинять комплексний захисний вплив при низьких температурах довкілля. Значну роль у патогенезі ХТ відіграє запалення [9], тому перспективними фригопротекторами є інгібітори каскаду арахідонової кислоти. За результатами скринінгу низки нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП) [10, 11], найвиразніший фригопротекторний ефект, що не залежить від селективності щодо ізоформ циклооксигенази, притаманний диклофенаку натрію та еторикоксибу. Подальші дослідження конкретизували вплив цих засобів на стан ЦНС [12], перебіг стрес-реакції, видільну та серцево-судинну системи [13], енергетичний обмін [14], каскад арахідонової кислоти [15], систему гемостазу [16].

З-поміж сполук, що мають протизапальні та знеболювальні властивості й можуть бути перспективними як потенційні фригопротектори, привертають увагу оригінальні похідні 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину [17–20]. Їх синтезовано у відділі синтезу фізіологічно-активних речовин ДУ “Інститут фармакології та токсикології Національної академії медичних наук України” під керівництвом д. фармацев. наук, проф. А. М. Демченка.

Мета дослідження – виконати скринінг низки найактивніших сполук на фригопротекторні властивості на моделі гострого загального охолодження (ГЗО) та поглиблено дослідити сполуку-лідера за критеріями впливу на температуру тіла, стан системи гемостазу, низку показників запального каскаду та NO-синтазу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження виконано у Навчально-науковому інституті прикладної фармації Національного фармацевтичного університету (м. Харків, Україна) з дотри-

манням принципів Директиви 2010/63/EU Європейського парламенту і Ради ЄС “Про охорону тварин, які використовуються з науковою метою”. Протоколи експериментів схвалила комісія з біоетики Національного фармацевтичного університету (протокол № 5 від 25.03.2021 р.).

Експерименти виконано на 32 білих рандомбредних мишах-самцях масою 20–25 г і 34 білих безпородних щурах-самцях масою 300–350 г. Стать тварин обрано на підставі вищої чутливості самців до гострого впливу холоду та виразнішого впливу фригопротекторів саме на самців [21]. Мишей та щурів утримували на стандартному харчовому раціоні віварію за умов вільного доступу до води, сталої вологості повітря, режиму світло/темрява 12/12 год і температурного режиму +22–23 °С.

Для скринінгу на фригопротекторну активність на мишах взято три похідні, що мають виразні протизапальні та знеболювальні властивості [17, 18]: (1-[5-бутирил-6-(4-ізопропілфеніл)-3-метил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл]-бутан-1-он), лабораторний шифр IFT-180; (1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон), лабораторний шифр IFT-247; (1-[5-ацетил-6-(4-метоксифеніл)-3-метил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон), лабораторний шифр IFT-251 (рис.).

Для моделювання гострого загального охолодження мишей утримували в індивідуальних пластикових клітках об’ємом 500 см³ без обмеження рухової активності та доступу повітря. Клітки розташовували в морозильній камері “Nord Inter-300” з прозорою кришкою при температурі –18 °С. Реєстрували час життя тварин [22]. Методом випадкового вибору сформували групи сполук: IFT-180 (n=6), IFT-247 (n=8), IFT-251 (n=6). Досліджувані сполуки вводили внутрішньошлунково (в/ш) крізь зонд у дозі 25 мг/кг [17, 18, 20] у формі водної суспензії, стабілізованої твіном-80, в об’ємі 0,1 мл на 10 г маси за 60 хв до холодової експозиції. У групі препарату

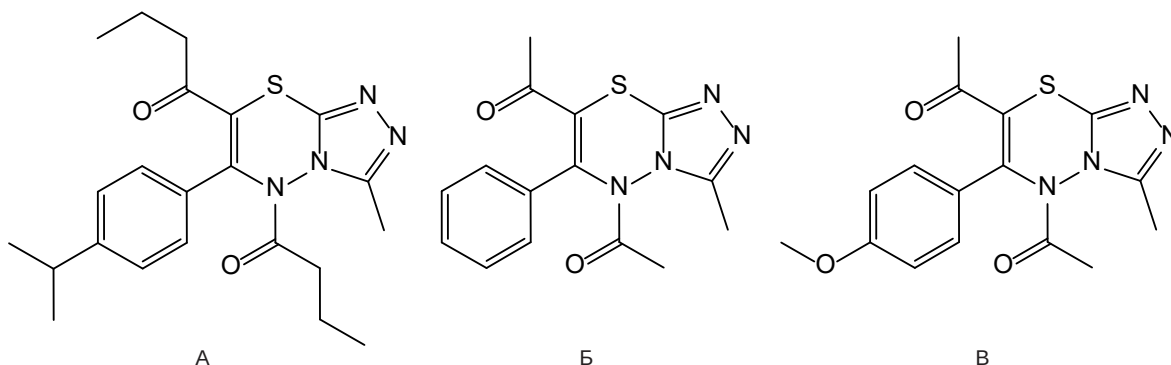


Рис. Структурні формули похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину: А – IFT-180; Б – IFT-247; В – IFT-251.

порівняння (n=6) використовували диклофенак натрію (Вольтарен, таблетки, "Novartis", Швейцарія) – засіб з доведеною фригопротекторною активністю в дозі 14 мг/кг в/ш в аналогічному об'ємі [10]. Мишам контрольної групи (n=6) вводили еквівалентну кількість розчинника (носія).

Поглиблене дослідження лідера скринінгу (ним виявилася сполука IFT-247) виконували на щурах, у яких ГЗО моделювали шляхом двогодинної експозиції при $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ в індивідуальних пластикових пеналах об'ємом 5000 см^3 [22, 23]. Ректальну температуру до та безпосередньо після холодової експозиції вимірювали цифровим термометром Gamma Thermo Base. Експериментальні групи сформовано методом випадкового вибору таким чином: група сполуки IFT-247 (n=7) – щури отримували її в/ш у дозі 18 мг/кг (її визначено шляхом перерахунку з дози мишей з урахуванням коефіцієнта видової стійкості [24]) у формі водної суспензії з твіном-80 в об'ємі 2 мл/кг за 60 хв до початку холодової експозиції; група препарату порівняння (n=10) – тваринам вводили в/ш диклофенак натрію в дозі 7 мг/кг також у вигляді водної суспензії з твіном-80 в об'ємі 2 мл/кг [15, 23]; групи інтактного контролю (n=9) і контрольної патології (n=8) – щури отримували в/ш розчинник (носій) в об'ємі 2 мл/кг.

Через 5–10 хв після завершення холодової експозиції та вимірювання ректальної температури щурів піддавали евтаназії під загальною анестезією тіопентал-натрієм (40 мг/кг) та отримували кров шляхом декапітації. Одержували плазму і сироватку крові. У плазмі визначали протромбіновий час (ПЧ), тромбіновий час (ТЧ), активований частковий протромбіновий час (АЧТЧ), фібриноген; використовували набори BioSystem S.A. (Іспанія). У сироватці крові вимірювали залишкову кількість щурячого протромбіну, тромбіну, фібриногену, а також D-димер методом імуноферментного аналізу за допомогою видоспецифічних наборів Rat Prothrombin ELISA Kit, Rat TM (Thrombin) ELISA Kit, Rat FG (Fibrinogen) ELISA Kit, Rat D-Dimer, D2D ELISA Kit (MyBioSource, США) на приладі LAB Analyt M201 Microplate Reader. Визначення фібриногену одночасно в плазмі та сироватці крові є спеціальним методичним підходом, що ми запропонували в попередньому дослідженні [23]. Сироватку крові вважають вільною від фібриногену, позаяк при гемокоагуляції фібриноген перетворюється на фібрин, але його вміст у сироватці крові важливий з позиції зіставлення зі вмістом D-димеру.

У щурів вилучали печінку та заморожували її рідким азотом, зберігаючи до аналізу в морозильній камері при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Імуноензиматичними

методами в гомогенаті печінки визначали вміст низки маркерів запалення: 5-ліпоксигеназу (5-ЛОГ), лейкотриєн В4 і тотальні лейкотриєни; низку інтерлейкінів (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10), фактор некрозу пухлини- α (TNF- α); NO-синтазу (NOS). Використовували видоспецифічні набори Rat 5-lipoxygenase (5-LO) ELISA Kit, Rat Leucotriene B4 (LTB4) ELISA Kit (Competitive ELISA), Rat Total Leucotriene (LT) ELISA Kit (Competitive ELISA), Rat Interleukin 1 Beta (IL1b) ELISA Kit, Rat Interleukin 4 (IL4) ELISA Kit, High Sensitivity Rat Interleukin 6 (IL6) ELISA Kit, Rat Interleukin 10 (IL10) ELISA Kit, Rat TNF alpha PicoKine ELISA Kit, Rat Nitric Oxide Synthase (NOS) PicoKine ELISA Kit виробництва "MyBioSource" (США).

Для статистичної обробки результатів використано програму STATISTICA 10.0. За критерієм Шапіро – Вілка і значеннями коефіцієнтів асиметрії та ексцесу відхилено гіпотезу нормальності. Центральні тенденції незалежних вибірок порівнювали за тестом Краскела – Волліса. Достовірність змін температури всередині кожної групи в динаміці оцінювали за парним критерієм Вілкоксона. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$. Результати наведено як середні арифметичні зі стандартними помилками ($M \pm m$), медіани з 25 і 75 % процентилями ($Me [Q25; Q75]$).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Як видно з таблиці 1, у скринінговому дослідженні сполука IFT-180 не вплинула на час життя мишей за умов холодової експозиції. Отже, вона не має фригопротекторних властивостей. Сполука IFT-251 тенденційно збільшила тривалість життя щодо контролю на 8,2 %, а сполука IFT-247 – статистично значуще на 43,6 % ($p < 0,01$), не поступаючись диклофенаку натрію, що збільшив час виживання мишей на 50,9 % ($p < 0,01$). Отже, у поглиблене дослідження взято лідера скринінгу – сполуку IFT-247.

У поглибленому дослідженні на щурах фригопротекторні властивості сполуки IFT-247 підтверджено результатами термометрії (табл. 2). Вихідна ректальна температура щурів усіх груп не мала значущих відмінностей. У групі контрольної патології протягом двогодинної холодової експозиції вона знизилася щодо вихідної в середньому на $2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($p < 0,001$). При впливі сполуки IFT-247 і препарату порівняння диклофенаку натрію зниження температури становило лише $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ – достовірно менше, ніж у групі контрольної патології (відповідно, $p < 0,01$, $p < 0,05$).

У найгостріший період ХТ у щурів змінювалися коагулологічні показники (табл. 3). У групі контрольної патології значно (в середньому на

Таблиця 1 – Вплив похідних 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину на час життя мишей на моделі гострої загальної повітряної гіпотермії (M±m; Me[Q25; Q75])

Група	Доза, мг/кг	Час життя, хв	Відмінності щодо контролю, %
Інтактний контроль (n=6)	–	56,2±4,8 60,5 [50,0; 65,0]	–
Диклофенак натрію (n=6)	7,0	84,8±6,2** 79,0 [77,0; 90,0]	+50,9
IFT-180 (n=6)	25,0	55,2±3,7 56,0 [46,0; 63,0]	-1,8###
IFT-247 (n=8)	25,0	80,3±4,7** 81,0 [69,65; 87,0]	+43,6
IFT-251 (n=6)	25,0	60,8±4,5 65,0 [55,0; 69,0]	+8,2##

Примітки:

- Статистично значущі відмінності з інтактним контролем: ** – $p < 0,0$; з показником групи диклофенаку натрію: ## – $p < 0,01$, ### – $p < 0,01$.
- n – кількість тварин у групі.

Таблиця 2 – Вплив сполуки IFT-247 на ректальну температуру щурів на моделі гострої загальної повітряної гіпотермії (M±m; Me[Q25; Q75])

Група	Ректальна температура, °C		
	вихідна	через 2 год перебування при -18 °C	різниця
Інтактний контроль (n=9)	36,8±0,14 36,7 [36,6; 37,0]		
Холодова травма			
Контрольна патологія (n=8)	37,2±0,12 37,1 [37,0; 37,4]	35,2±0,47 ^{&##} 35,4 [35,0; 36,0]	-2,0±0,46 -1,7 [-1,93; -1,3]
Диклофенак натрію, 7 мг/кг (n=10)	36,8±0,16 36,85 [36,5; 37,1]	36,3±0,28 [§] 36,55 [35,9; 37,0]	-0,5±0,23### -0,3 [-0,8; -0,1]
IFT-247, 15 мг/кг (n=7)	36,7±0,17 37,1 [36,7; 37,6]	36,2±0,31 [§] 36,75 [36,0; 37,1]	-0,5±0,22## -0,4 [-1,0; -0,2]

Примітки:

- Статистично значущі відмінності з показником групи контрольної патології: # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$; з вихідним показником тієї ж групи: § – $p < 0,05$, &## – $p < 0,001$.
- n – кількість тварин у групі.

26,8 %, $p < 0,001$ проти інтактного контролю) збільшився ТЧ. Під впливом диклофенаку натрію він зріс у вигляді тенденції на 5,8 %, а на тлі використання сполуки IFT-247 – на 13,1 % щодо інтактного контролю. Ці значення достовірно поступалися показникові контрольної патології. Вміст фібриногену в плазмі крові щурів групи контрольної патології збільшився на 21,7 % ($p < 0,05$), під впливом диклофенаку натрію і сполуки IFT-247 – тенденційно, відповідно, на 18,4 та 6,2%.

Як видно з таблиці 3, у сироватці крові тварин групи контрольної патології виразно (в середньому в 3,1 раза) збільшився вміст D-димеру щодо інтактного контролю ($p < 0,001$). На тлі використання диклофенаку натрію та, особливо, сполуки IFT-247 спостерігали значно менше зростання (відповідно, в 1,8 й 1,5 раза), а рівень D-димеру в крові був достовірно нижчим, ніж у щурів групи контрольної патології. При цьому в групі диклофенаку натрію вміст D-димеру достовірно перевищував показник інтактних тварин ($p < 0,05$).

Рівень сироваткового фібриногену зазнав аналогічних змін. Він виявився максимальним у групі контрольної патології (у 2,2 раза вищий за інтактний контроль, $p < 0,001$), а в групах диклофенаку натрію і сполуки IFT-247 це збільшення становило в середньому, відповідно, 1,4 ($p < 0,05$) та 1,6 раза ($p < 0,01$). Важливо, що концентрація фібриногену в сироватці крові тварин обох останніх груп статистично значуще поступалася такій у щурів групи контрольної патології.

Залишковий вміст протромбіну в сироватці крові щурів усіх груп зростав, особливо у групі контрольної патології (в 3,2 раза щодо інтактного контролю, $p < 0,05$), у групі диклофенаку натрію – менш виразно, тенденційно, а під впливом сполуки IFT-247 – достовірно у 2,5 раза ($p < 0,05$). Рівень тромбіну практично не зазнав змін.

Ці результати, як і в публікації [16], вказують на те, що в найгостріший період ХТ у щурів групи контрольної патології виникають тромбоз та гострий синдром дисемінованого внутрішньосудинного згортання (ДВЗ-синдром). Його пряма ознака – значне зростання рівня D-димеру,

Таблиця 3 – Вплив сполуки IFT-247 та диклофенаку натрію на коагулологічні показники щурів із холодовою травмою (M±m; Me[Q25; Q75])

Біомаркер	Інтактний контроль (n=5)	Холодова травма		
		контрольна патологія (n=5)	диклофенак натрію (n=5)	IFT-247 (n=6)
Плазма крові				
ПЧ, с	18,3±0,88 18,9 [16,8; 19,8]	17,2±0,42 17,5 [16,9; 17,8]	20,04±1,15 20,0 [18,5; 21,5]	19,43±1,10 19,45 [17,4; 20,5]
ТЧ, с	43,62±1,08 44,7 [43,0; 45,0]	55,30±1,00*** 54,4 [53,9; 55,7]	46,16±3,54# 43,7 [39,7; 50,6]	49,35±1,69# 48,65 [45,5; 52,3]
АЧТЧ, с	20,84±1,04 20,3 [18,8; 22,1]	21,84±1,69 23,8 [18,0; 22,4]	23,60±1,21 24,1 [21,1; 25,9]	22,05±1,76 20,5 [19,4; 22,3]
Фібриноген, г/л	4,83±0,16 5,0 [4,8; 5,0]	5,88±0,31* 5,7 [5,4; 5,5]	5,72±0,37 5,6 [5,0; 6,5]	5,13±0,61 5,55 [3,9; 6,5]
Сироватка крові				
Протромбін, пг/мл	95,82±16,84 100,485 [62,435; 136,7]	305,58±77,26* 244,3 [213,4; 305,5]	231,36±87,09 202,2 [127,5; 211,1]	236,82±51,17* 198,75 [132,1; 362,7]
Тромбін, пг/мл	37,82±1,18 37,92 [35,81; 40,885]	43,420±2,38 43,9 [38,76; 45,63]	39,80±1,57 39,61 [38,76; 43,03]	41,20±2,03 41,213 [38,76; 45,63]
Фібриноген, нг/мл	150,36±15,22 159,90 [120,795; 185,05]	326,74±29,68*** 333,1 [317,9; 371,1]	217,12±21,67** 228,0 [171,1; 250,3]	234,22±18,64*** 235,25 [199,6; 247,9]
D-димер, нг/мл	844,2±79,8 754,45 [679,35; 1090,5]	2596,0±219,2*** 2542,45 [2282,0; 2689,0]	1490,5±254,1*** 1433,0 [1161,0; 1491,0]	1289,4±311,6## 1020,9 [864,4; 1807,1]

Примітки:

1. Статистично значущі відмінності: * – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001 щодо інтактного контролю; # – p<0,05, ## – p<0,01 щодо контрольної патології.
2. n – кількість визначень показника.

важливого маркера тромбоемболоутворення [25], з яким може бути пов'язане збільшення ТЧ у групі контрольної патології. Тромбіновий час характеризує фінальну стадію каскаду згортання крові – перетворення фібриногену на фібрин. Збільшення ТЧ вказує на швидкий перехід до гіпокоагуляційної стадії ДВЗ-синдрому. Швидкий розвиток ДВЗ-синдрому при ХТ спостерігали й в інших експериментальних [26, 27] і клінічних дослідженнях [28, 29]. Наші результати підтверджують ці дані вже для найгострішого періоду ХТ.

Як зазначено вище, вміст фібриногену зазвичай визначають у плазмі крові. Але він наявний і в сироватці крові, хоча його рівень на вісім порядків нижчий, ніж у плазмі. Разом із визначенням D-димеру цей маркер можна тлумачити як продукт деградації фібрину. Його збільшення причетне до розвитку артеріального тромбозу [30], що додатково доводить активацію тромбоемболоутворення та ризик виникнення тромботичних ускладнень при гострій ХТ.

І диклофенак натрію, і сполука IFT-247 значно зменшують несприятливий зсув гемокоагуляції в найгостріший період ХТ. Під впливом кожного засобу нормалізується ПЧ, а достовірні зміни ТЧ, АЧТЧ, фібриногену в плазмі крові відсутні. Достовірно щодо контрольної патології зниження вмісту D-димеру та фібриногену в сироватці крові на тлі використання обох засобів

вказує на менший ризик виникнення тромбозу і ДВЗ-синдрому вже в найгострішу фазу ХТ. Однакова антигіпотермічна активність диклофенаку натрію та сполуки IFT-247 (див. табл. 2) відповідає їх близькій антитромботичній ефективності при гострій ХТ (див. табл. 3).

Як видно з таблиці 4, у щурів групи контрольної патології швидко виникла системна запальна реакція, пов'язана, зокрема, з активацією ліпоксигеназного шляху каскаду арахідонової кислоти. У печінці збільшився вміст тотальних лейкотриєнів (в 1,9 раза, p<0,01), зокрема лейкотриєну В4 (в 1,6 раза, p<0,05).

Це може бути зумовлено підвищенням активності 5-ЛОГ, позаяк кількість цього ензиму виявилась майже однаковою в усіх групах (див. табл. 4). Диклофенак натрію зменшував вміст лейкотриєнів достовірно щодо показників групи контрольної патології (p<0,05), сполука IFT-247 – тенденційно, і їх вміст у печінці тварин цих груп не мав значущих відмінностей стосовно показників інтактних тварин. Це вказує на протизапальний вплив обох досліджуваних фригопротекторів.

Цитокінова ланка запальної відповіді за умов ГЗО мала у щурів групи контрольної патології певні особливості (див. табл. 4). Жоден із трьох досліджуваних прозапальних цитокінів (IL-1β, IL-6, TNF-α) не зазнав статистично значущих змін

Таблиця 4 – Вплив сполуки IFT-247 та диклофенаку натрію на вміст 5-ліпоксигенази, лейкотриєнів, інтерлейкінів і NO-синтази в печінці щурів із холодовою травмою (M±m; Me[Q25; Q75])

Біомаркер	Інтактний контроль (n=8)	Холодова травма		
		контрольна патологія (n=5)	диклофенак натрію (n=5)	IFT-247 (n=6)
5-ЛОГ, нг/г	160±3,65 163 [155,5; 168,5]	174±4,46 172 [167; 183]	166±1,93 165 [163; 166]	135±22,0 153,5 [135; 170]
Тотальні лейко-триєни, пг/г	1785±241 1998,5 [1073; 2321,5]	3479±274** 3770 [2938; 3778]	2171±216# 1994 [1982; 2097]	2839±291 2838,7 [2274; 3144]
Лейкотриєн В4, пг/г	702±49,3 782,5 [549,5; 808,5]	1113±62,7* 1077 [1039; 1150]	791±63,0# 783 [744; 912]	859±104,2 934,5 [710; 990]
IL-1β, нг/г	6,02±0,28 5,95 [5,275; 6,69]	7,45±1,21 6,21 [5,60; 7,95]	3,98±0,40*** 3,46 [3,41; 4,29]	3,80±0,18*** 3,84 [3,55; 4,10]
IL-6, нг/г	0,21±0,02 0,22 [0,16; 0,25]	0,15±0,04 0,11 [0,11; 0,16]	0,15±0,02 0,15 [0,14; 0,16]	0,18±0,03 0,16 [0,12; 0,18]
TNF-α, нг/г	1,59±0,16 1,475 [1,210; 1,935]	2,84±0,47 2,70 [2,25; 3,54]	1,76±0,06# 1,77 [1,69; 1,83]	1,50±0,13# 1,575 [1,16; 1,65]
IL-4, нг/г	8,92±0,78 8,86 [7,09; 10,80]	5,22±0,15** 5,24 [4,93; 5,35]	6,17±0,79* 5,85 [4,82; 7,22]	5,11±0,22*** 5,07 [4,88; 5,48]
IL-10, нг/г	1,86±0,06 1,915 [1,73; 2,01]	1,07±0,06*** 1,09 [0,98; 1,12]	1,25±0,08* 1,16 [1,13; 1,43]	1,19±0,07* 1,205 [1,10; 1,23]
NOS, нг/г	171±7,54 166,5 [153,3; 187,5]	117±9,23* 116 [103; 127]	158±3,73# 160 [152; 164]	153±3,40# 154 [147; 158]

Примітки:

1. Статистично значущі відмінності: * – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001 щодо інтактного контролю; # – p<0,05 щодо контрольної патології.
2. n – кількість визначень показника.

щодо інтактного контролю (хоча вміст IL-1β тенденційно збільшився в 1,2 раза, а TNF-α – в 1,8 раза, p>0,05). Але при цьому значно (в 1,7 раза) знизився рівень протизапальних цитокінів IL-4 (p<0,01) та IL-10 (p<0,001).

Фригопротекторний ефект диклофенаку натрію та сполуки IFT-247 характеризувався статистично значущим зменшенням вмісту IL-1β як щодо контрольної патології (майже у 2 рази, p<0,05), так і щодо інтактного контролю (в 1,5–1,6 раза, p<0,001). Рівень IL-6 на тлі використання обох засобів практично не змінювався, а вміст TNF-α знижувався до значень інтактних тварин та був достовірно меншим стосовно контрольної патології (p<0,05). Натомість уміст протизапальних цитокінів IL-4 та IL-10 залишався достовірно зменшеним проти показників інтактного контролю і майже не відрізнявся від значень контрольної патології (див. табл. 4).

Отже, при ГЗО виник дисбаланс про- та протизапальних цитокінів. Співвідношення їх сумарних кількостей в інтактних щурів становило 0,73 (табл. 5). Як видно з таблиць 4 і 5, за умов ГЗО у групі контрольної патології здебільшого статистично значуще знижувався рівень низки протизапальних цитокінів (IL-4, IL-10), тимчасом як кількість прозапальних цитокінів (IL-1β, TNF-α) зростала тенденційно, а вміст IL-6 не зазнав суттєвих змін. Як наслідок співвідношення суми про- та протизапальних цитокінів збільшилося щодо інтактного контролю у 2,3 раза (див. табл. 5).

Проте в механізмі фригопротекторної дії диклофенаку натрію та сполуки IFT-247 бере участь достовірно зменшення вмісту IL-1β і TNF-α до субнормальних (IL-1β) та нормальних (TNF-α) значень без суттєвого впливу на решту досліджених цитокінів (див. табл. 4), що виводить

Таблиця 5 – Зміни кількісного співвідношення низки про- та протизапальних цитокінів у печінці щурів із гострою холодовою травмою і вплив на нього фригопротекторів – диклофенаку натрію та сполуки IFT-247

Група	Сумарний вміст, нг/г		Співвідношення прозапальних/ протизапальних цитокінів
	прозапальні цитокіни IL-1β, IL-6, TNF-α	протизапальні цитокіни IL-4, IL-10	
Інтактний контроль	7,82	10,78	0,73
Гостра холодова травма без корекції (контрольна патологія)	10,44	6,29	1,66
Диклофенак натрію + гостра холодова травма	5,89	7,42	0,79
IFT-247 + гостра холодова травма	5,48	6,30	0,86

їх баланс на новий рівень з переважанням протизапальних: співвідношення про- і протизапальних цитокінів зменшується вдвічі та практично досягає значення інтактного контролю (див. табл. 5).

Рівень NOS у печінці щурів групи контрольної патології знизився в 1,5 раза щодо інтактного контролю ($p < 0,05$). Це відповідає даним [31] про зменшення продукції NO у щурів при ГЗО та може віддзеркалювати адаптивну реакцію на загальне охолодження, скеровану на пригнічення вироблення монооксиду азоту і, відповідно, на вазоконстрикцію задля зменшення втрат тепла. Під впливом диклофенаку натрію та сполуки IFT-247, що зменшували ступінь гіпотермії, рівень NOS не зазнав змін і залишився на рівні інтактного контролю (див. табл. 4), достовірно перевищуючи значення контрольної патології ($p < 0,05$). Такий результат, очевидно, пов'язаний з меншим ступенем гіпотермії та вказує на відсутність обмежень синтезу NO. Він може свідчити про збереження функціональної активності ендотелію та фізіологічних функцій монооксиду азоту на тлі застосування обох досліджуваних фригопротекторів.

Таким чином, з-поміж трьох досліджуваних похідних, що мають властивості НПЗП, лише 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5H-[1,2,4]тріазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон (IFT-247), у дозах 25 мг/кг у мишей і 18 мг/кг у щурів в/ш, проявляє виразну фригопротекторну активність на моделі ГЗО, не поступаючись диклофенаку натрію. Відсутність фригопротекторних властивостей у споріднених сполук IFT-180 та IFT-251, що чинять виразний протизапальний ефект [17–19], не суперечить участі запалення як важливої складової патогенезу ХТ, позаяк виразний захисний ефект при ХТ проявляють не всі класичні інгібітори циклооксигенази. Зокрема, не є ефективними фригопротекторами мефенамінова кислота [10] і парацетамол [11], а протизапальний та фригопротекторний ефекти НПЗП дисоціюють [32]. Сполука IFT-247 на рівні диклофенаку натрію збільшує час життя мишей при ГЗО; запобігає розвитку ДВЗ-синдрому в найгостріший період гострої ХТ; пригнічує запальну відповідь переважно шляхом зменшення вмісту лейкотриєну В4 і тотальних лейкотриєнів, а також прозапальних цитокінів IL-1 β та TNF- α ; запобігає зниженню рівня NOS. За характером впливу на гемостаз, запальні маркери та NOS сполука IFT-247 наближається до препарату порівняння диклофенаку натрію, що має доведені фригопротекторні властивості. Ці результати доповнюють фармакологічну характеристику досліджуваного представника 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5H-[1,2,4]тріазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіа-

зинів як потенційного протизапального, знеблювального і фригопротекторного засобу та обґрунтовують доцільність його подальшого поглибленого вивчення. Зокрема, важливо визначити вплив сполуки IFT-247 на стан циклооксигеназного шляху каскаду арахідонової кислоти, тромбоцитарну ланку гемостазу, стан системного та локального кровообігу, метаболізм, а також органотропні ефекти досліджуваної сполуки в динаміці перебігу гострої холодової травми у відновний період.

ВИСНОВКИ. 1. За результатами скринінгу трьох похідних 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5H-[1,2,4]тріазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазину, фригопротекторна активність не є загальною ознакою сполук цього ряду. Потужні фригопротекторні властивості на рівні препарату порівняння диклофенаку натрію проявляє 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5H-[1,2,4]тріазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон (IFT-247).

2. Сполука IFT-247 статистично значуще збільшує час життя мишей з моделлю гострого загального охолодження (25 мг/кг у шлунок) та зменшує ступінь гіпотермії у щурів за умов двогодинної експозиції при $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (18 мг/кг).

3. У найгостріший період холодової травми в щурів досліджувана сполука запобігає розвитку ДВЗ-синдрому і тромбозу, зменшуючи вміст D-димеру та фібриногену в сироватці крові й нормалізуючи збільшений тромбіновий час.

4. Сполука IFT-247 при гострій холодовій травмі пригнічує розвиток системної запальної реакції: запобігає збільшенню вмісту лейкотриєнів (В4 і тотальних), поступаючись за цією властивістю диклофенаку натрію; подібно до диклофенаку натрію значно знижує до субнормального рівня IL-1 β та до нормального – TNF- α без впливу на IL-6 і на зменшений вміст протизапальних цитокінів – IL-4 та IL-10, нормалізує збільшене співвідношення про- і протизапальних цитокінів.

5. При холодовій травмі рівень NOS у печінці щурів групи контрольної патології знижується в 1,5 раза щодо інтактного контролю, що вказує на зменшення продукції NO та може віддзеркалювати адаптивну реакцію на загальне охолодження – вазоконстрикцію задля зменшення втрат тепла. Під впливом диклофенаку натрію та досліджуваної сполуки рівень NOS залишається на рівні інтактного контролю.

6. 1-(5-Ацетил-3-метил-6-феніл-5H-[1,2,4]тріазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон є перспективним фригопротектором. Доцільними є подальші поглиблені дослідження механізмів його активності та впливу на стан окремих органів і систем при холодовій травмі.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Nagarajan S. Update: Cold weather injuries, active and reserve components U.S. Armed Forces, July 2010–June 2015 [Electronic resource] / S. Nagarajan // *Medical Surveillance Monthly Report*. – 2015. – **22** (10). – P. 7–12. Mode of access: <https://health.mil/News/Articles/2023/11/01/Cold-Weather-Injuries>.
2. Neurovascular hand symptoms in relation to cold exposure in northern Sweden: a population-based study / A. Stjernbrandt, B. Bjor, M. Andersson [et al.] // *International archives of occupational and environmental health*. – 2017. – **90** (7). – P. 587–595. DOI: 10.1007/s00420-017-1221-3.
3. Shakirov B. M. Frostbite injuries and our experience treatment in the Samarkand area Uzbekistan. [Electronic resource] / B. M. Shakirov // *International journal of burns and trauma*. – 2020. – **10** (4). – P. 156–161. Mode of access : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7486564/>.
4. QuickStats: Death Rates Attributed to Excessive Cold or Hypothermia Among Persons Aged ≥ 15 Years, by Urban-Rural Status and Age Group. National Vital Statistics System, United States, 2019 // *Morbidity and Mortality Weekly Report*. – 2021. – **70** (7). – P. 258–262. DOI: 10.15585/mmwr.mm7007a6.
5. Cold Weather Injuries, Active and Reserve Components, U.S. Armed Forces, July 2014 – June 2019. [Electronic resource] // *Medical Surveillance Monthly Report*. – 2019. – **26** (11). – P. 17–27. Mode of access : <https://www.health.mil/News/Articles/2019/11/01/Cold-Weather-Injuries>.
6. Fudge J. Exercise in the Cold: Preventing and Managing Hypothermia and Frostbite Injury / J. Fudge // *Sports Health*. – 2016. – **8** (2). – P. 133–139. DOI: 10.1177/1941738116630542.
7. Кравець О. В. Оптимізоване життєзабезпечення при ненавмисному загальному переохолодженні організму (науково-літературний огляд) / О. В. Кравець, В. В. Єхалов, В. А. Седінкін // *Медицина невідкладних станів*. – 2022. – № 18 (1). – С. 12–20. DOI: 10.22141/2224-0586.18.1.2022.1453.
8. Як уникнути переохолодження: нагадуємо основні правила поведінки у холод [Електронний ресурс]. – 2019. – Режим доступу : <https://moz.gov.ua/article/news/jak-uniknuti-pereoholodzhennja-nagadue-mo-osnovni-pravila-povedinki-u-holod>.
9. Gross E. A. Using thrombolytics in frostbite injury / E. A. Gross, J. C. Moore // *Journal of Emergencies, Trauma, and Shock*. – 2012. – **5** (3). – P. 267–271. DOI: 10.4103/0974-2700.99709.
10. Капелька І. Г. Скринінгове дослідження фригопротекторних властивостей нестероїдних протизапальних препаратів за гострого загального охолодження / І. Г. Капелька, С. Ю. Штриголь // *Фармакологія та лікарська токсикологія*. – 2019. – № 13 (5). – С. 338–343. DOI: 10.33250/13.05.338.
11. Скринінг низки інгібіторів каскаду арахідонової кислоти на фригопротекторні властивості / І. Г. Капелька, С. Ю. Штриголь, Р. Б. Лесик [та ін.] // *Фармакологія та лікарська токсикологія*. – 2020. – № 14 (2). – С. 122–128. DOI: 10.33250/14.02.122.
12. Effect of arachidonic acid cascade inhibitors on body temperature and cognitive functions in rats in the Morris water maze after acute cold injury / I. Kapelka, S. Shtrygol', O. Koiro [et al.] // *Pharmazie*. – 2021. – **76** (7). – P. 313–316. DOI: 10.1691/ph.2021.1571.
13. The influence of non-steroidal anti-inflammatory drugs with different mechanisms of action on the course of stress reaction, the functional state of kidneys, liver, and heart on the model of acute general cooling / S. Shtrygol', O. Koiro, O. Kudina [et al.] // *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. – 2022. – **2** (36). – P. 46–55. DOI: 10.15587/2519-4852.2022.255797.
14. Comparative analysis of the effect of diclofenac sodium and etoricoxib on energy metabolism in rat liver in the acute general cooling model / S. Yu. Shtrygol', O. O. Koiro, O. V. Kudina [et al.] // *Мед. перспективи*. – 2022. – No. 27 (4). – С. 51–57. DOI: 10.26641/2307-0404.2022.4.271171.
15. The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs with different mechanisms of action on the body temperature and cyclooxygenase pathway of the arachidonic acid cascade on the model of acute general cooling (air hypothermia) in rats / S. Shtrygol', O. Tovchiga, O. Kudina [et al.] // *Ceska a Slovenska Farmacie*. – 2022. – **71** (5). – P. 214–222. DOI: 10.5817/CSF2022-5-214.
16. Effects of non-steroidal anti-inflammatory agents on systemic hemostasis during the most acute period of cold injury in rats / S. Shtrygol', A. Taran, T. Yudkevich [et al.] // *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. – 2023. – **6** (46). – P. 25–30. DOI: 10.15587/2519-4852.2023.294311.
17. Анальгезивна та протизапальна дії похідних 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4-в][1,3,4]тіадіазину / О. Є. Ядловський, А. Я. Коваль, Н. М. Серединська [та ін.] // *Мед. та клініч. хімія*. – 2015. – **17**, № 2. – С. 33–38. DOI: 10.11603/mcch.2410-681X.2015.v17.i2.4866.
18. Пошук нових знеболювальних та протизапальних засобів серед похідних 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4] тріазоло[3,4-в][1,3,4]тіадіазину / О. Є. Ядловський, А. Я. Коваль, Т. А. Бухтіарова [та ін.] // *Acta Medica Leopoliensia*. – 2015. – № 21 (4). – С. 59–63. DOI: 10.11603/mcch.2410-681X.2015.v17.i2.4866.
19. An overview on 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives as potential anesthetic and anti-inflammatory agents / A. Koval, A. Lozynskyi, S. Shtrygol', R. Lesyk // *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. – 2022. – **2** (36). – P. 10–17. DOI: 10.15587/2519-4852.2022.255276.
20. Коваль А. Я. 1-(5-Ацетил-3-метил-6-феніл-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4-в][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон: дозозалежність аналгетичного ефекту, відсутність опіоїдергічного механізму дії, вплив на поведінкові реакції та гостра токсичність / А. Я. Коваль, С. Ю. Штриголь // *Acta Medica Leopoliensia*. – 2023. – № 21 (3–4). – С. 192–203. DOI: 10.25040/aml2023.3-4.192.
21. Волощук Н. І. Статеві особливості виживання тварин за гострої холодової травми та корекції глюкозаміну гідрохлоридом / Н. І. Волощук, А. В. Юхимчук // *Фармакологія та лікарська токсикологія*. – 2023. – № 17 (4). – С. 248–254. DOI: 10.33250/17.04.248.
22. Холодова травма: доклінічне вивчення лікарських препаратів з фригопротекторними властивостями: метод. рек. / [уклад. Є. В. Бондарєв та ін.]. – Харків : НФУ, 2018. – 35 с.
23. Shtrygol' S. Effects of non-steroidal anti-inflammatory agents on systemic hemostasis during the most acute period of cold injury in rats / S. Shtrygol', A. Taran, T. Yudkevich // *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. – 2023. – **6** (46). – P. 25–30. DOI: 10.15587/2519-4852.2023.294311.

24. Експериментальне вивчення токсичної дії потенційних лікарських засобів / В. М. Коваленко, О. В. Стефанов, Ю. М. Максимов, І. М. Трахтенберг // Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рек. / за ред. О. В. Стефанова. – К. : Авіцена, 2001. – С. 74–97.

25. Adelborg K. Disseminated intravascular coagulation: epidemiology, biomarkers, and management / K. Adelborg, J. B. Larsen, A.-M. Hvas // *British Journal of Haematology*. – 2021. – **192** (5). – P. 803–818. DOI: 10.1111/bjh.17172.

26. Юхимчук А. В. Вплив глюкозаміну на стан системи згортання крові у самців та самок щурів за гострої холодової травми / А. В. Юхимчук, Н. І. Волощук, С. Ю. Штриголь // Клінічна фармакологія сьогодні: шляхи максимальної допомоги лікарській спеціальності : матеріали XII Всеукр. наук.-практ. конф. за участю міжнародних спеціалістів з клінічної фармакології (Вінниця, 9–10 листоп. 2023 р.). – Вінниця : ТОВ "Твори", 2023. – С. 170–172.

27. Бондарев Є. В. Експериментальне обґрунтування оптимізації профілактики та лікування холодової травми засобами метаболітогеної та протизапальної дії : дис. ... д-ра фармац. наук : 14.03.05 / Бондарев Євген Вікторович. – Харків, 2020. – 431 с.

28. Expert consensus on the prevention, diagnosis and treatment of cold injury in China / Jin Hong-Xu, Teng Yue, Dai Jing, Zhao Xiao-Dong // *Military Medical Research*. – 2021. – **8**. – Article number 6. DOI: 10.1186/s40779-020-00295-z.

29. Rathjen N. A. Hypothermia and Cold Weather Injuries [Electronic resource] / N. A. Rathjen, S. D. Shahbodaghi, J. A. Brown // *American Family Physician*. – 2019. – **100** (11). – P. 680–686. Mode of access : <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2019/1201/p680.html>.

30. Stroke. Pathophysiology, diagnosis, and management. 4th edition / ed. by J. P. Mohr. – New York: Churchill Livingstone, 2004. – 1591 p. DOI: 10.1016/B0-443-06600-0/X5001-9.

31. Vascular mechanisms in the formation of gender differences in the protective effect of glucosamine in experimental cold injury / A. V. Yuhimchuk, N. I. Voloshchuk, S. Yu. Shtrygol' [et al.] // *World of Medicine and Biology*. – 2023. – **4** (86). – P. 243–247. DOI: 10.26724/2079-8334-2023-4-86-243-247.

32. Капелька І. Г. Характеристика протизапальної дії диклофенаку натрію за низької та нормальної температури / І. Г. Капелька, С. Ю. Штриголь // *Вісн. фармації*. – 2020. – № 2 (100). – С. 106–112. DOI: 10.24959/nphj.20.37.

REFERENCES

1. Nagarajan, S. (2015). Update: Cold weather injuries, active and reserve components U.S. Armed Forces, July 2010-June 2015. *MSMR*, 22(10), 7-12. Retrieved from <https://health.mil/News/Articles/2023/11/01/Cold-Weather-Injuries>.

2. Stjernbrandt, A., Björ, B., Andersson, M., Burström, L., Liljelind, I., Nilsson, T., Lundström, R., Wahlström, J. (2017). Neurovascular hand symptoms in relation to cold exposure in northern Sweden: a population-based study. *International archives of occupational and environmental health*, 90(7), 587-595. DOI: 10.1007/s00420-017-1221-3.

3. Shakirov, B.M. (2020). Frostbite injuries and our experience treatment in the Samarkand area Uzbekistan. *International journal of burns and trauma*, 10(4), 156-161. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7486564/>.

4. QuickStats: Death Rates Attributed to Excessive Cold or Hypothermia Among Persons Aged ≥15 Years, by Urban-Rural Status and Age Group. National Vital Statistics System, United States, 2019. (2021). *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 70(7), 258-262. DOI: 10.15585/mmwr.mm7007a6.

5. Cold Weather Injuries, Active and Reserve Components, U.S. Armed Forces, July 2014 – June 2019. (2019). *Medical Surveillance Monthly Report*, 26(11), 17-27. Retrieved from <https://www.health.mil/News/Articles/2019/11/01/Cold-Weather-Injuries>.

6. Fudge, J. (2016). Exercise in the Cold: Preventing and Managing Hypothermia and Frostbite Injury. *Sports Health*, 8(2), 133-139. DOI: 10.1177/1941738116630542.

7. Kravets, O., Yekhalov, V., Sedinkin, V. (2022). Optimized life support in accidental general hypothermia (scientific and literature review). *Emergency medicine*, 18(1), 12-20 [in Ukrainian]. DOI: 10.22141/2224-0586.18.1.2022.1453.

8. How to avoid hypothermia: a reminder of the basic rules of behavior in the cold. (2019). [in Ukrainian]. Retrieved from <https://moz.gov.ua/article/news/jak-uniknuti-pereoholodzhennja-nagaduemo-osnovni-pravilapovedinki-u-holod>.

9. Gross, E.A., Moore, J.C. (2012). Using thrombolytics in frostbite injury. *Journal of emergencies, trauma, and shock*, 5(3), 267-271 DOI: 10.4103/0974-2700.99709.

10. Kapelka, I. G., Shtrygol' S.Yu. (2019). The comparative research of frigoprotective properties of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the model of acute general cooling. *Pharmacology and Drug Toxicology*, 13(5), 338-343 [in Ukrainian]. DOI: 10.33250/13.05.338.

11. Kapelka, I.G., Shtrygol' S.Yu., Lesyk, R.B., Lozynskyi, A.V., Khomyak, S.V., Novikov V.P. (2020). The comparative research of arachidonic acid cascade inhibitors for frigoprotective activity. *Pharmacology and Drug Toxicology*, 14(2), 122-128 [in Ukrainian]. DOI: 10.33250/14.02.122.

12. Kapelka, I.G., Shtrygol' S.Yu., Koירו, O.O., Merzlikin, S.I., Kudina, O.V., Yudkevich T.K. (2021). Effect of arachidonic acid cascade inhibitors on body temperature and cognitive functions in rats in the Morris water maze after acute cold injury. *Pharmazie*, 76(7), 313-316. DOI: 10.1691/ph.2021.1571.

13. Shtrygol', S., Koiro, O., Kudina, O., Tovchiga, O., Yudkevych, T., Oklei, D. (2022). The influence of non-steroidal anti-inflammatory drugs with different mechanisms of action on the course of stress reaction, the functional state of kidneys, liver, and heart on the model of acute general cooling. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, 36(2). 46-55. DOI: 10.15587/2519-4852.2022.255797.
14. Shtrygol', S., Koiro, O., Kudina, O., Yudkevych, T., Gorbach, T. (2022). Comparative analysis of the effect of diclofenac sodium and etoricoxib on energy metabolism in rat liver in the acute general cooling model. *Med. perspekt.* 27(4), 51-57. DOI: 10.26641/2307-0404.2022.4.271171.
15. Shtrygol', S., Tovchiga, O., Kudina, O., Koiro, O., Yudkevich, T., Gorbach, T. (2022). The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs with different mechanisms of action on the body temperature and cyclooxygenase pathway of the arachidonic acid cascade on the model of acute general cooling (air hypothermia) in rats. *Čes. slov. Farm.*, 71(5), 214-222. DOI: 10.5817/CSF2022-5-214.
16. Shtrygol', S., Taran, A., Yudkevych, T., Lytkin, D., Lebedinets, I., Chuykova, P., Koiro, O. (2023). Effects of non-steroidal anti-inflammatory agents on systemic hemostasis during the most acute period of cold injury in rats. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, 46(6), 25-30. DOI: 10.15587/2519-4852.2023.294311.
17. Yadloviskyi, O.Ye., Koval, A.Ya., Seredynska, N.M., Bukhtiarova, T.A., Bershova, T.A., Demchenko D.A., Bobkova, L.S., Demchenko A. M. (2015). Analgesic and anti-inflammatory activity of 5,7-diacyl-3-H(alkil)-6-aryl-5H-[1,2,4]triazol[3,4-b][1,3,4]tiadiazin derivatives. *Medical and Clinical Chemistry*, 17(2), 33-38 [in Ukrainian]. DOI: 10.11603/mcch.2410-681X.2015.v17.i2.4866.
18. Yadloviskyi, O.Y., Koval, A.Ya., Bukhtiarova, T.A., Khomenko, V.S., Omelianenko, Z.P., Bobkova, L.S., Demchenko, D.A., Demchenko, A.M. (2015). Search of new analgesic and anti-inflammatory substances among 5,7-diacyl-3-h(alkil)-6-aryl-5H-[1,2,4]triazol[3,4-b][1,3,4]tiadiazin derivatives. *Acta Medical Leopoliensia*, 21(4), 59-63 [in Ukrainian]. DOI: 10.11603/mcch.2410-681X.2015.v17.i2.4866.
19. Koval, A., Lozynskyi, A., Shtrygol', S., Lesyk R. (2022). An overview on 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives as potential anesthetic and anti-inflammatory agents. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, 36(2), 10-17. DOI: 10.15587/2519-4852.2022.255276.
20. Koval, A., Shtrygol', S. (2023). 1-(5-acetyl-3-methyl-6-phenyl-5h-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazin-7-yl)-ethanone: dose-dependence of analgesic effect, lack of opioidergic mechanism of action, effect on behavioral reactions and acute toxicity. *Acta Medica Leopoliensia*, 29(3-4), 192-203 [in Ukrainian]. DOI: 10.25040/aml2023.3-4.192.
21. Voloshchuk, N.I., Yuhimchuk A.V. (2023). Sex peculiarities of survival of animals with acute cold injury and correction with glucosamine hydrochloride. *Pharmacology and Drug Toxicology*, 17(4), 248-254 [in Ukrainian]. DOI: 10.33250/17.04.248.
22. Bondarev, Ye.V., Shtrygol', S.Yu., Drogovoz, S.M., Shchokina, K.G. (2018). Cold injury: preclinical study of drugs with frigoprotective properties: Guidelines [in Ukrainian]. Kharkiv: NFU, 35.
23. Shtrygol', S., Taran, A., Yudkevich T. (2023). Effects of non-steroidal anti-inflammatory agents on systemic hemostasis during the most acute period of cold injury in rats. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, 46(6), 25-30. DOI: 10.15587/2519-4852.2023.294311.
24. Kovalenko, V.M., Stefanov, O.V., Maksimov, Yu.M., Trachtenberg I.M. (2001). Experimental study of the toxic effect of potential medicinal products. In *Preclinical studies of medicinal products: Guidelines*. Edited by Stefanov, O.V. [in Ukrainian]. Kyiv: Avicena, 74-97.
25. Adelborg, K., Larsen, J.B., Hvas, A.-M. (2021). Disseminated intravascular coagulation: epidemiology, biomarkers, and management. *British Journal of Haematology*, 192, 803-818. DOI: 10.1111/bjh.17172.
26. Yuhimchuk, A.V., Voloshchuk, N.I., Shtrygol', S.Yu. (2023). The effect of glucosamine on the blood coagulation system in male and female rats with acute cold injury. In *Clinical pharmacology today: ways of maximum assistance to the medical specialty*: Proceedings of the XII Ukrainian scientific-and-practical; conference with participants of foreign specialists in clinical pharmacology. Vinnitsia, November, 9-10, 2023, 170-172 [in Ukrainian].
27. Bondarev, Ye.V. (2020). Experimental substantiation of optimization of cold injury prevention and treatment with the preparations targeting metabolism and inflammation. Thesis for a Doctor of Pharmaceutical Sciences Degree. National Pharmaceutical University of the Ministry of Healthcare of Ukraine, Kharkiv, 431 [in Ukrainian].
28. Jin Hong-Xu, Teng Yue, Dai Jing, Zhao Xiao-Dong (2021). Expert consensus on the prevention, diagnosis and treatment of cold injury in China. *Military Medical Research*, 8, 6. DOI: 10.1186/s40779-020-00295-z.
29. Rathjen, N.A., Shahbodaghi, S.D., Brown J.A. (2019). Hypothermia and Cold Weather Injuries. *American Family Physician*, 100 (11), 680-686. Retrieved from: <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2019/1201/p680.html>.
30. Mohr, J.P. (ed.) (2004). *Stroke Pathophysiology, diagnosis, and management. 4th ed.* New York: Churchill Livingstone, 2004. 1591. DOI: 10.1016/B0-443-06600-0/X5001-9.
31. Yuhimchuk, A.V., Voloshchuk, N.I., Shtrygol', S. Yu., Nefodov, O.O., Piliponova, V.V., Oliinyk, Yu.M., Tepla, A.M., Nefodova, O.O. (2023). Vascular mechanisms in the formation of gender differences in the protective effect of glucosamine in experimental cold injury. *World of Medicine and Biology*, 86(4), 243-247. DOI: 10.26724/2079-8334-2023-4-86-243-247.
32. Kapelka, I.G., Strygol', S.Yu. (2020). The characteristics of the anti-inflammatory action of sodium diclofenac in cold and normal environment. *News of Pharmacy*, 100(2), 106-112 [in Ukrainian]. DOI: 10.24959/nphj.20.37.

Отримано 16.07.2024

Адреса для листування: А. Я. Коваль, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, вул. Пекарська, 69, Львів, 79010, Україна, email: andrij_koval@ukr.net.

FRIGOPROTECTIVE PROPERTIES OF 5,7-DIACYL-3-H(ALKYL)-6-ARYL-5H-[1,2,4]TRIAZOL[3,4-b][1,3,4]THIADIAZINE DERIVATIVES IN THE EXPERIMENT

Summary

Introduction. The widespread occurrence of cold injuries, along with the insufficient effectiveness of prevention and treatment of acute cold trauma, underscores the relevance of searching for new cryoprotective agents, among which anti-inflammatory drugs play a significant role.

The aim of the study – to perform research of 5,7-diacyl-3-H(alkyl)-6-aryl-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazines (laboratory codes IFT-180, IFT-247, IFT-251) for cryoprotective properties using an acute general cooling (AGC) model.

Research Methods. The experiments were conducted on male white non-linear mice and rats. The studied compounds at a dose of 25 mg/kg and the reference drug diclofenac sodium (14 mg/kg) were administered intragastrically 60 minutes before exposing the animals to cold at -18 °C. The lifespan of the mice was determined. In the in-depth study using the AGC model (2-hour exposure at -18 °C), the effect of the lead compound IFT-247 at a dose of 18 mg/kg and the reference drug diclofenac sodium (7 mg/kg) on the rectal temperature of rats was examined. The impact of the mentioned compound on the hemostasis system was also assessed. In the liver, the levels of several inflammation markers were measured using species-specific kits.

Results and Discussion. It was found that compound IFT-247 exhibited potent cryoprotective properties at the level of the reference drug, statistically significantly increasing the lifespan of mice under the AGC model. IFT-247 reduced the degree of hypothermia during a two-hour exposure at -18 °C (15 mg/kg). The tested compound prevented the development of disseminated intravascular coagulation (DIC) syndrome and thrombosis, reducing the levels of D-dimer and fibrinogen in the blood serum and normalizing the prolonged thrombin time to the level of diclofenac sodium. IFT-247 inhibited the development of a systemic inflammatory response: it prevented the increase in leukotriene B₄ and total leukotrienes, though to a lesser extent than diclofenac; similarly to the reference drug, it significantly reduced IL-1 β levels to subnormal and TNF- α levels to normal without affecting IL-6 or the decreased levels of anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10, and it normalized the elevated pro- to anti-inflammatory cytokine ratio.

Conclusion. It was established that 1-(5-acetyl-3-methyl-6-phenyl-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazine-7-yl)-ethanone exhibits promising cryoprotective properties.

KEY WORDS: cold injury, experiment, 5,7-diacyl-3-H(alkyl)-6-aryl-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazine derivatives, body temperature, hemostasis system, markers of inflammation.