

Міністерство охорони здоров'я України  
Національний фармацевтичний університет

МИХАЙЛЮК ЄВГЕНІЙ ОЛЕГОВИЧ

УДК: 615.31.015.547.792]:616.36-002-021.6

ФАРМАКОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ НОВИХ ПОХІДНИХ 4-R-5-(АЛКІЛ-, АРИЛ-,  
ГЕТЕРИЛ-)-1,2,4-ТРИАЗОЛУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ТОКСИЧНОМУ  
ГЕПАТИТІ

14.03.05 – фармакологія

АВТОРЕФЕРАТ  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата фармацевтичних наук

Харків – 2015

**Дисертацією є рукопис.**

Робота виконана на кафедрі клінічної фармації, фармакотерапії та управління і економіки фармації факультету післядипломної освіти Запорізького державного медичного університету МОЗ України.

**Науковий керівник:** доктор медичних наук, професор  
**Білай Іван Михайлович,**  
Запорізький державний медичний університет МОЗ України,  
завідувач кафедри клінічної фармації, фармакотерапії та  
управління і економіки фармації факультету  
післядипломної освіти

**Офіційні опоненти:** доктор фармацевтичних наук, професор  
**Яковлева Лариса Василівна,**  
Національний фармацевтичний університет МОЗ України,  
завідувач кафедри фармакоелектрофізіології;

доктор фармацевтичних наук, старший науковий  
співробітник  
**Гордієнко Анатолій Дмитрович,**  
Харківська державна зооветеринарна академія  
МОН України,  
професор кафедри фармакології та токсикології.

Захист відбудеться «\_\_\_» жовтня 2015 року о \_\_\_\_\_ год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.03 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4).

Автореферат розісланий \_\_\_ вересня 2015 року.

Учений секретар  
спеціалізованої вченої ради Д 64.605.03  
д.фарм. н., професор

Т. С. Сахарова

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Печінка є одним з найважливіших органів, що забезпечує сталість внутрішнього середовища організму. Це унікальний і складно функціонуючий орган, що є центральним у метаболізмі білків, вуглеводів, жирів і відіграє важливу роль у метаболізмі лікарських препаратів (В.Т. Івашкин, Т.Л. Лапина, 2014).

Згідно з сучасними даними опублікованими ВООЗ, на патологію печінки скаржаться 30 % населення планети, при чому у 10 % хворих на гострий гепатит, розвивається хронічна форма захворювання печінки. Насамперед, в Україні за останні 10 років захворюваність на гепатити зросла на 76,6 %, а розповсюдженість – у 2,2 разу. Смертність за останні 20 років зросла вдвічі, причому 60 % хворих складають люди працездатного віку (Т.Д. Звягинцева, А.И. Чернобай, 2014).

Сучасна фармацевтична наука створює лікарські засоби, що впливають безпосередньо на причинні фактори захворювань. Разом з тим, етіологія багатьох хвороб гепатобіліарної системи на сьогоднішній день ще не встановлена, що не дозволяє списувати з рахунків препарати патогенетичної спрямованості, які надають пригнічуючий ефект на первинні або вторинні механізми розвитку патологічного процесу (В.О. Астахіна, И.Ф. Беленичев и соавт., 2011–2015). Сучасний фармацевтичний ринок налічує велику кількість гепатотропних препаратів з гепатопротекторними властивостями, перш за все, до них відносять лікарські засоби, дія яких спрямована на нормалізацію метаболізму, підвищення стійкості до дії патогенних факторів, нормалізацію функціональної активності та стимуляцію репаративно-регенеративних процесів у печінці. Єдиної класифікації гепатотропних препаратів не існує, тому їх поділяють залежно від походження: гепатопротектори рослинного, тваринного походження, есенціальні фосфоліпіди, амінокислоти, вітаміни та вітаміноподібні речовини, антиоксиданти, комбіновані лікарські засоби (Н.В. Харченко, Г.А. Анохіна та співавт., 2013). Однак досвід їх практичного застосування показує, що широко застосовувані препарати, які діють на гепатобіліарну систему, не позбавлені здатності спричинювати віддалені ускладнення і навіть найсучасніші препарати мають значні побічні ефекти (О.Ю. Гумінська, 2014; В.П. Присяжнюк, 2015).

Вченим України належить пріоритет розробки нового оригінального високоефективного лікарського засобу, який проявляє гепатопротекторні властивості – тіотриазоліну, який являє собою морфоліній 3-метил-1,2,4,-триазолін-5-тіоацетат (І.А. Мазур та співавт., 1997). Цей препарат має достатню доказову базу своєї ефективності при лікуванні гепатитів різних етіологій, як гострої, так і хронічної форми. Тіотриазолін гарно зарекомендував себе при застосуванні при алкогольних гепатитах, що є великою проблемою вітчизняної медицини. Також в багатьох експериментах була доведена його безпечність навіть при тривалому застосуванні. Тому велику зацікавленість у пошуку високоефективних та безпечних гепатопротекторних засобів викликають гетероциклічні системи, зокрема похідні 1,2,4-тріазолу (В.А. Черноус и соавт., 2013).

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація виконана згідно з планами проблемної комісії «Фармакологія» МОЗ України та науково-дослідної роботи Запорізького державного медичного університету за темою: «Гіполіпідемічна активність нових похідних п'яти- та шестичленних азаетероциклів і фітопрепаратів при гіперліпідемії та маркетингові дослідження ринку антиатеросклеротичних засобів» (номер державної реєстрації 0111U005855), у якій автор є співвиконавцем.

**Мета і задачі дослідження.** Метою даної роботи є експериментальне обґрунтування пошуку гепатопротекторних засобів серед вперше синтезованих похідних 4-R-5-(алкіл-, арил-, гетерил-)-1,2,4-тріазолу шляхом встановлення закономірностей між хімічною будовою і фармакологічною активністю.

Для реалізації поставленої мети були окреслені такі задачі:

1. Провести комп'ютерне прогнозування ймовірних фармакологічних властивостей за допомогою комп'ютерної програми PASS та гострої токсичності 37 вперше синтезованих похідних 4-R-5-(алкіл-, арил-, гетерил-)-1,2,4-тріазолу за допомогою комп'ютерної програми ГУСАР.
2. Визначити гостру токсичність 37 вперше синтезованих похідних 4-R-5-(алкіл-, арил-, гетерил-)-1,2,4-тріазолу.
3. На етапі скринінгу за гепатопротекторною активністю виявити та відібрати для поглибленого фармакологічного вивчення сполуку-лідера з вираженою гепатопротекторною дією.
4. Провести порівняльний аналіз залежності «хімічна будова-фармакологічний ефект» похідних 4-R-5-(алкіл-, арил-, гетерил-)-1,2,4-тріазолу.
5. Вивчити гепатопротекторну дію та розрахувати ЕД<sub>50</sub> сполуки-лідера за умов гострого тетрахлорметанового гепатиту у щурів.
6. Дослідити виразність гепатопротекторної, антиоксидантної, гіполіпідемічної дії сполуки-лідера на тлі парацетамолового гепатиту.
7. Дослідити гепатопротекторну, антиоксидантну та гіполіпідемічну дію сполуки-лідера за умов субгострого алкогольного гепатиту.

*Об'єкт дослідження.* Токсичний гепатит.

*Предмет дослідження.* Гепатопротекторні властивості похідних 1,2,4-тріазолу в умовах експериментального токсичного гепатиту.

*Методи дослідження.* При виконанні роботи були використані фармакологічні, токсикологічні, біохімічні, морфологічні методи дослідження, методи комп'ютерного прогнозування та методи математичної статистики.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Уперше теоретично та експериментально обґрунтована доцільність пошуку гепатопротекторних засобів серед похідних 1,2,4-тріазолу, як на підставі результатів комп'ютерного прогнозування, так і в умовах фармакологічного експерименту. Встановлена найбільш виражена гепатопротекторна дія у 3 сполук (під шифрами 2.8, 2.11 та 2.29), які виявили здатність до гальмування цитолізу гепатоцитів краще за препарат порівняння тіотриазолін за зниженням активності АлАТ (на 76,71 %, 68,59 %, 62,69 % та 57,08 % відповідно). Визначено параметри гострої токсичності нових похідних 4-R-5-(алкіл-, арил-, гетерил-)-1,2,4-тріазолу при внутрішньошлунковому

введенні та встановлено, що  $LD_{50}$  досліджуваних сполук знаходиться в діапазоні 668–2430 мг/кг і речовини відносяться до IV класу токсичності за класифікацією К.К. Сидорова (1973 р.). Доповнено наукові дані щодо закономірностей залежності фармакологічної активності та токсичності від хімічної структури вперше синтезованих похідних 4-R-5-(алкіл-, арил-, гетерил-)-1,2,4-тріазолу із заданою фармакологічною активністю. Встановлено, що прояву гепатопротекторної дії у більшості речовин сприяє приєднання гетерильного залишку по 5-му положенню тріазолу, солі які містять алкільний радикал за  $N_4$  атомом тріазолового ядра проявляли найнижчу токсичність. Серед похідних 1,2,4-тріазолу відібрана найбільш активна речовина 4-аміно-5-(фуран-2-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-тіол (шифр 2.8), яку було рекомендовано для подальших доклінічних випробувань.

Отримано нові наукові дані, щодо специфічної фармакологічної активності сполуки 2.8 за умов гострого та субгострого експериментальних гепатитів, які адекватні клінічним варіантами гепатитів у людини. На тлі гострого парацетамолового гепатиту доведено виражену гепатопротекторну дію сполуки 2.8, яка перевищувала препарат порівняння за рахунок зменшення проявів цитолізу, усунення явищ холестазу, пригнічення процесів ПОЛ. Доведено більш виражену ніж у препараті порівняння гепатопротекторну дію сполуки 2.8 за умов субгострого алкогольного гепатиту, що супроводжувалося виразнішим відновленням гепатоцитів, що підтверджувалось відповідними змінами досліджуваних показників.

Дістало подальшого розвитку уявлення про фармакологічну активність похідних 4-R-5-(алкіл-, арил-, гетерил-)-1,2,4-тріазолу за умов токсичного ураження печінки різного генезу.

**Практичне значення одержаних результатів.** Результати досліджень є експериментальним обґрунтуванням поглибленого фармакологічного та подальшого доклінічного і клінічного вивчення нового вітчизняного гепатопротекторного засобу, активною речовиною якого буде 4-аміно-5-(фуран-2-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-тіол. Це дозволить збільшити асортимент вітчизняних гепатопротекторів та дозволить оптимізувати профілактику та лікування захворювань печінки.

За результатами експериментальних досліджень запропоновано спосіб лікування алкогольного гепатиту (інформаційний лист МОЗ України № 160 – 2014, 2014 р.), а також спосіб одержання хімічної речовини морфолін 2-(4-(2-метоксіфеніл)-5-(пірідін-4-іл)-4н-1,2,4-тріазол-3-ілтіо) ацетат, який виявляє гепатопротекторні властивості (патент України на корисну модель № 87589, 2013).

Результати дослідження впроваджено в науково-педагогічний процес кафедри фармакології та клінічної фармакології ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» (протокол № 14 від 11.03.2014 р.), кафедри клінічної фармації та клінічної фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова (протокол № 16 від 14.03.2014 р.), кафедри клінічної фармакології та фітотерапії Національної медичної академії післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика (протокол № 15 від 11.03.2014 р.), кафедри фармакології Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького (протокол № 12 від 12.03.2014 р.).

**Особистий внесок здобувача.** Під час роботи над дисертацією здобувачем разом з науковим керівником визначена мета дослідження, шляхи її реалізації, проведено планування та особисто виконана експериментальна частина роботи. Проведена статистична обробка та узагальнення отриманих результатів, формування основних положень та висновків, що захищаються. Розроблені та визначені науково-методичні підходи щодо скринінгу, встановлення закономірностей «хімічна структура – фармакологічна активність» похідних 4-R-5-(алкіл-, арил-, гетерил-)-1,2,4-тріазолу.

Співавторами наукових праць є науковий керівник, а також науковці, разом із якими проводились спільні дослідження.

**Апробація результатів дисертації.** Матеріали дисертаційної роботи доповідалися й обговорювалися на XXVIII науково-практичній конференції з міжнародною участю «Ліки-людині» (Харків, 2011); науково-практичній конференції студентів і молодих учених за участю міжнародних спеціалістів «Працюємо, творимо, презентуємо» (Івано-Франківськ, 2011); IV Національному з'їзді фармакологів України (Київ, 2011); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 2011); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2011» (Запоріжжя, 2011); Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання створення нових лікарських засобів» (Харків, 2012); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики» (Запоріжжя, 2012); міжнародній науково-практичній конференції «Клінічна фармакологія та фармакотерапія захворювань в світлі доказової медицини» (Вінниця, 2013); XVII Міжнародному медичному конгресі студентів та молодих вчених (Тернопіль, 2013); Всеукраїнській науково-практичній конференції «Медична наука – 2013» (Полтава, 2013); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2014» (Запоріжжя, 2014); XVIII Міжнародному медичному конгресі студентів та молодих вчених (Тернопіль, 2014).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 15 робіт, у тому числі 6 статей, з яких 5 у фахових вітчизняних виданнях та 1 міжнародна стаття, 7 тез доповідей, виданий 1 патент України на корисну модель та 1 інформаційний лист.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, розділу "Матеріали та методи дослідження", трьох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел літератури. Загальний обсяг дисертації складає 168 сторінок друкованого тексту. Робота ілюстрована 36 таблицями та 22 рисунками. Список використаних джерел літератури містить 298 посилань, з яких 150 – кирилицею та 148 – латиною.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріали та методи дослідження.** Досліди виконані на 753 статевозрілих білих нелінійних щурах самцях масою 220-260 г. Тварини отримані з розплідника ДУ «Інститут фармакології і токсикології АМН України» та утримувалися на стандартному раціоні харчування при природному світловому режимі «день-ніч». Дослідження проводили з урахуванням «Правил доклінічної оцінки безпеки фармакологічних засобів (GLP)» (Ю.В. Буров, 1992). Забій тварин виконували відповідно до «Методичних рекомендацій по виведенню тварин з експерименту» (1986). При роботі з щурами дотримувались вітчизняного документу «Загальні етичні принципи експерименту на тваринах» (Україна, 2001), що узгоджені з положеннями міжнародного документу «Європейська Конвенція про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Протоколи досліджень та їх результати затверджені рішенням комісії з біоетики ЗДМУ (протокол № 9 від 24.12.2014 р.).

У дослідженнях були використані 37 нових органічних сполук у ряду заміщених 1,2,4-тріазолу. Дані речовини синтезовані в лабораторії органічного синтезу кафедри токсикологічної та неорганічної хімії Запорізького державного медичного університету під керівництвом д. фарм. н., проф. О.І. Панасенка та д. фарм. н., проф. Є.Г. Книша. Будова синтезованих сполук підтверджена методами елементного аналізу, ІЧ- і УФ-спектроскопії, ПМР-спектрометрії. Тонкошаровою хроматографією підтверджена індивідуальність синтезованих сполук. Визначення температури плавлення проведено відповідно до вимог Державної фармакопеї України (доповнення 3, 2010). Дані сполуки є кристалічними речовинами білого, жовтого та коричневого кольору, не розчинні у воді та розчинні у органічних розчинниках, солі досліджуваних сполук були гідрофільними речовинами.

Прогнозування біологічної активності проводили за допомогою комп'ютерної програми PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) *in silico*. Хімічні структури сполук вводились за допомогою комп'ютерної програми ChemOffice 2006 (утиліта ChemDraw Ultra 10.0) у вигляді файлу з розширенням mol (D.A. Filimonov, A.V. Zakharov et al, 2009). Для прогнозування гострої токсичності нами була використана програма ГУСАР (GUSAR) з джерела <http://pharmaexpert.ru/GUSAR/acutoxpredict.html>. GUSAR включає в себе останні досягнення в галузі QSAR моделювання: узгодженість прогнозу, оцінку галузі застосування, внутрішні та зовнішні перевірки моделей і чітку інтерпретацію отриманих результатів (A. Lagunin, A. Zakharov et al, 2011).

Вивчення гострої токсичності виконували згідно з експрес-методом по В.Б. Прозоровському (2007). Клас токсичності визначали згідно з класифікацією К.К. Сидорова (1973).

Фармакологічний скринінг гепатопротекторних властивостей похідних 4-R-5- (алкіл-, арил-, гетерил-)-1,2,4-тріазолу проводили на моделі гострого тетрахлорметанового гепатиту відповідно до Методичних рекомендацій ДЕЦ МОЗ України (2001). Досліджувані речовини вводили внутрішньошлунково у дозі 1/10 від LD<sub>50</sub> за 1 годину до та через 2 години після введення тетрахлорметану. Забір

крові для біохімічних досліджень проводили через 24 години після останнього введення тетрахлорметану (О.В. Стефанов, 2001). У тварин під ефірним наркозом розтинали черевну порожнину, із клубової артерії забирали кров, отримували сироватку, яку використовували для визначення активності аланінамінотрансферази (АлАТ), аспартатамінотрансферази (АсАТ), лужної фосфатази (ЛФ),  $\gamma$ -глутамілтранспептидази ( $\gamma$ -ГТ), рівня загального холестерину (ЗХС) та тригліцеридів (ТГ). Активність АлАТ та АсАТ визначали за допомогою діагностичних наборів Cormay, Liquick Cor-AlAT та Cormay, Liquick Cor-ASAT (А. Dembinska-Kies, J.W. Naskalski, 1998). Для підтвердження патології з боку гепатобіліарної системи розраховували коефіцієнт Де Рітіса, який дорівнює відношенню активності АсАТ до АлАТ. Зниження цього показника  $< 1$  свідчить про патологію печінки (О.В. Стефанов, 2001).

Для визначення активності ЛФ використовували кінетичний метод за допомогою діагностичних наборів Cormay, Liquick Cor-ALP (С.А. Burtis, Е.Р. Ashwood, 2006). Активність  $\gamma$ -ГТ визначали кінетичним методом за допомогою діагностичного набору Cormay, Liquick Cor-GGT за методикою (Н.В. Alan, 2006).

Як препарат порівняння використовували тіотриазолін (таблетки 100 мг, №30, корпорація «Arterium», Київмедпрепарат, Україна, серія № 53081 VI14), який має гепатопротекторну дію та є структурним аналогом досліджуваних речовин. Тіотриазолін вводили внутрішньошлунково в дозі 50 мг/кг (О.С. Хухліна, 2002).

Наступним етапом досліджень було визначення середньоєфективної дози ( $ED_{50}$ ) сполуки-лідера при внутрішньошлунковому введенні. Визначення проводили на підставі залежності ефективності сполуки від використаних доз (1/20, 1/10, 1/5 від  $LD_{50}$ ) методом пробіт-аналізу. Вираженість гепатопротекторної дії сполуки-лідера визначали за здатністю зменшувати активність АлАТ та рівня тіобарбітурової кислоти активних продуктів (ТБК-АП) (Прозоровский В.Б., 2007). АлАТ визначали за допомогою набору Cormay, Liquick Cor-AlAT. Рівень ТБК-АП визначали в тесті з тіобарбітуровою кислотою (Л.И. Андреева, Л.А. Кожемякин, 1988)

Під час вивчення специфічної фармакологічної активності нами були використані гостра парацетамолова модель та субгостра алкогольна модель гепатиту (Стефанов О.В., 2001).

Ефективність випробовуваних сполук за умов усіх моделей токсичного гепатиту оцінювали за здатністю до відновлення цілісності мембран гепатоцитів (зниження активності АлАт, АсАт,  $\gamma$ -ГТ та ЛФ) та антиоксидантної дії (вплив на показники процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) – рівень ТБК–АП, дієнових кон'югатів (ДК), триєнових кон'югатів (ТК) та антиоксидантної системи (АОС) – рівень  $\alpha$ -токоферолу ( $\alpha$ -ТФ) у тканині печінки), також визначали показники ліпідного обміну (рівень ЗХС та ТГ).

Визначення активності АлАт, АсАт,  $\gamma$ -ГТ та ЛФ проводили за вищезгаданими методиками.

Ступінь антиокиснювальної активності (АОА) та інтенсивності процесів ПОЛ за модельованих форм токсичного гепатиту оцінювали за рівнем ДК (В.С. Коган, О.Н. Орлов, Л.Л. Прилипко, 1986) та ТК (И.А. Волчегорский, А.Г. Налимов и соавт.,



1989), за вмістом ТБК–АП (Л.И. Андреева, Л.А. Кожемякин, 1988), рівнем ендогенного  $\alpha$ -ТФ (І.Ф. Беленічев та співавт., 1992).

Рівень загального та прямого білірубіну визначали за Йендрашиком у сироватці крові (Б.Д. Луцик, 2011).

Стан ліпідного обміну за модельних форм токсичного гепатиту оцінювали за рівнем ЗХС та ТГ, які визначали ферментативними методами за допомогою наборів фірми Cormay, (Liquick Cor-CHOL та Liquick Cor-TG) (Н.В. Alan, 2006).

Також були проведені морфологічні дослідження печінки в умовах моделювання субгострого алкогольного отруєння і після внутрішньошлункового введення досліджуваної речовини 4-аміно-5-(фуран-2-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-тіолу.

Перед забором матеріалу піддослідних тварин присипляли за допомогою інгаляційного наркозу з використанням етилового ефіру. Під час аутопсії проводили візуальну оцінку стану органів грудної та черевної порожнини. Щурів та їх органи зважували на аптечних вагах і обчислювали відносну масу (%). Забирали невелику частину правої частки тканини печінки щурів, яку переносили відразу у рідину Буена. Забір органів проводили протягом 5-7 хвилин з моменту смерті (А.И. Старков, В.В. Серов, 1995). Отриманні шматочки печінки піддавали відповідній обробці для підготовки мікропрепаратів та проведення гістологічних досліджень за допомогою загальноприйнятих методів світлової мікроскопії (Н.У. Kasper, U. Drebber, I. Hirsch, 2006).

Для виявлення в гепатоцитах алкогольного амілоїду використовували реакцію по Маллорі з забарвленням. Для виявлення вмісту глікопротеїдів і глікогену проводили постановку ШИК реакції з забарвленням ядер гематоксиліном. Для виявлення глікогену перед ШИК-реакцією зрізи інкубували в розчині амілази. Оцінку отриманих результатів проводили напівкількісним методом запропонованим автором (Г.Г. Автандилов, 1990).

Результати досліджень оброблені сучасними статистичними методами аналізу на персональному комп'ютері з використанням стандартного пакету програм Microsoft Office 2007 та «Statistica for Windows 6.0» (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5). Розраховували середні арифметичні (M) та стандартні похибки середньої ( $\pm m$ ). Достовірність міжгрупових відмінностей розраховували за допомогою параметричного t-критерію Ст'юдента. Використовувалися 3 рівні статистичної значущості відмінностей результатів досліджень -  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ; та  $p < 0,001$  (С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, Н.Н. Бабич, 2001; О.Ю. Реброва, 2002).

**Результати та їх обговорення.** Перед початком фармакологічних досліджень проведено комп'ютерне прогнозування токсичності 37 хімічних сполук серед похідних 1,2,4-тріазолу за допомогою програми ГУСАР (GUSAR) з джерела <http://pharmaexpert.ru/GUSAR/acutoxpredict.html>, яке показало, що речовини відносяться в основному до малотоксичних та практично нетоксичних речовин (III та IV клас токсичності за класифікацією К.К. Сидорова (1973)).

Також було проведено комп'ютерне прогнозування фармакологічних властивостей досліджуваних речовин. Хімічні структури сполук вводились за допомогою комп'ютерної програми ChemOffice 2006 (утиліта ChemDrawUltra 10.0) у вигляді файлу з розширенням mol та відправлялися на офіційний сайт прогнозу

спектру біологічної активності Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS) <http://pharmaexpert.ru/PASSonline/>. Серед 37 сполук 8 (2.2, 2.14, 2.15, 2.16, 2.18, 2.19, 2.20 та 2.37) здатні виявляти гепатопротекторну активність з інтервалом ймовірності 53,0–92,8%. 15 сполук (2.2, 2.5, 2.6, 2.8, 2.10, 2.22, 2.28, 2.29, 2.30, 2.31, 2.32, 2.33, 2.34, 2.35, 2.36) здатні знижувати активність ЛФ на 30,5–84,1 %. Сполука 2.8 показала ймовірність знижувати активність АсАТ до 40,1 % та білірубіноксидази до 37,9 %. На підставі отриманих результатів комп'ютерного прогнозування доведена перспективність досліджуваних похідних 1,2,4-тріазолу для пошуку гепатопротекторних засобів.

За результатами експериментального вивчення гострої токсичності 37 сполук похідних 1,2,4-тріазолу встановлено, що за значенням ЛД<sub>50</sub> (668 та 2430 мг/кг) вони відносяться до IV класу токсичності сполук та є малотоксичними за класифікацією К.К. Сидорова (1973). Найменш токсичними виявились сполуки 2.25 та 2.27 з показником токсичності LD<sub>50</sub> = 2430 мг/кг. Найбільш токсичними виявились сполуки 2.12 та 2.20 – LD<sub>50</sub> = 668 мг/кг. Варто відмітити 11 сполук (2.1, 2.4, 2.8, 2.13, 2.16, 2.17, 2.22, 2.25, 2.27, 2.29, 2.36), що показали рівень LD<sub>50</sub> більший за показник 1920 мг/кг. Встановлені закономірності відносно зв'язку хімічної будови з показником гострої токсичності досліджуваних сполук показали, що солі, які містять по 4 атому нітрогену алкільний радикал, проявляють найнижчу токсичність (сполуки 2.11, 2.12, 2.15, 2.19, 2.20).

Варто відмітити, що сполука 2.8, яка у подальших дослідженнях показала себе, як перспективна сполука для поглибленого фармакологічного вивчення мала показник ЛД<sub>50</sub> 1311 мг/кг.

У подальшому був проведений фармакологічний скринінг гепатопротекторних властивостей похідних 4-R-5-(алкіл-, арил-, гетерил-)-1,2,4-тріазолу в умовах експериментального тетрахлорметанового гепатиту.

Моделювання гострого токсичного гепатиту призвело до підвищення активності АсАТ та АлАТ, що свідчило про інтенсивність патологічного процесу та пошкодження гепатоцитів. При цьому коефіцієнт Де Рітца  $0,92 \pm 0,04$  свідчив про наявність патології саме з боку гепатобіліарної системи. Також спостерігалось значне підвищення активності ЛФ та  $\gamma$ -ГТ, що вказує на наявність холестазу, пошкодження гепатоцитів та атрофічні зміни у печінці. Таким чином, збільшення активності ферментів АлАТ, АсАТ, ЛФ та  $\gamma$ -ГТ свідчило про істотні порушення цілісності мембран гепатоцитів та дозволяє зробити висновок про адекватне відтворення модельної патології (В.О. Астахіна, И.Ф. Беленичев, М.В. Воевудский и соавт., 2011).

Вивчення ефективності похідних 1,2,4-тріазолу показало, що досліджувані речовини знижували активність АлАТ неоднозначно. Найбільш суттєво активність цього ферменту знижувала сполука 2.8 на 76,71 % ( $p < 0,05$ ). Дещо менше знижували активність АлАТ сполуки 2.12, 2.14, 2.16, 2.27 та 2.11 (на 57,53 %, 53,53 %, 60,08 %, 62,69 % та 68,59 % відповідно) ( $p < 0,05$ ). Препарат порівняння тіотриазолін поступався сполукам 2.8, 2.11 та 2.27 за виразністю зниження активності АлАТ (на 13,85 %, 7,57 %, 5,61 % відповідно) ( $p < 0,05$ ).

Також досліджувані сполуки неоднозначно знижували активність АсАТ. Найбільш виразно активність АсАТ знижувала сполука 2.11 на 77,42 % ( $p < 0,05$ ), яка також значно впливала на активність АлАТ на 68,59 % ( $p < 0,05$ ). Слід відмітити сполуки 2.3 та 2.12, які знижували активність АсАТ помірно (на 49,56 % та 57,35 % відповідно) ( $p < 0,05$ ). При цьому, сполуки 2.3, 2.11 та 2.27 не поступалися за активністю тіотриазоліну, що вказувало на їх здатність до захисту гепатоцитів при пошкодуючій дії на них тетрахлорметану.

Вивчення впливу досліджуваних похідних 1,2,4-тріазолу на активність  $\gamma$ -ГТ та ЛФ показало, що найбільш значно вони знижувалися при введенні сполуки 2.4 (на 69,29 % та 49,65 % відповідно) ( $p < 0,05$ ). Слід виділити сполуки 2.1, 2.2, 2.4, 2.8 та 2.10, які краще за референтний препарат, тіотриазолін, знижували активність  $\gamma$ -ГТ (на 61,20 %, 64,24 %, 69,29 %, 56,87 % та 50,95 % відповідно) ( $p < 0,05$ ).

Найбільш суттєво активність ЛФ знижувалася також під впливом сполук 2.27 на 43,41 % ( $p < 0,05$ ) та 2.32 на 34,24 % ( $p < 0,05$ ) відповідно. Помірно знижувалася активність цього ферменту при введенні сполук 2.37 на 22,18 % ( $p < 0,05$ ), 2.24 – на 27,67 % ( $p < 0,05$ ), та 2.14 – на 21,82 % ( $p < 0,05$ ). При чому, сполуки 2.4, 2.23, 2.27 та 2.32 за виразністю цього ефекту не поступалися препарату порівняння, тіотриазоліну, що вказувало на здатність зменшувати холестази у печінці.

Здатність досліджуваних сполук до захисту гепатоцитів призводить до відновлення холестеринсинтетичної функції печінки. За даними ліпідного складу сироватки крові видно, що найбільш суттєво рівень ЗХС та ТГ знижувала сполука 2.4 (на 29,96% та 49,31% відповідно). Слід відзначити сполуки 2.26, 2.27, 2.32, 2.22 та 2.21, які суттєво знижували рівень ЗХС (на 50,00 %, 42,75 %, 37,68 %, 34,78 % та 33,33 % відповідно) ( $p < 0,05$ ) та не поступалися тіотриазоліну – препарату порівняння. Сполуки 2.18 та 2.22 знижували рівень цього показника помірно (на 21,29 % та 26,23 % відповідно) ( $p < 0,05$ ). Найбільш істотну гіпотригліцеридемічну дію виявляли сполуки 2.27, 2.28, 2.32, 2.22 та 2.34 (зниження рівня ТГ на 55,41 %, 54,05 %, 49,32 % та 48,65 % відповідно) ( $p < 0,05$ ), що також не поступалися препарату порівняння.

За результатами вивчення гепатопротекторної активності похідних 1,2,4-тріазолу були встановлені деякі закономірності залежності «хімічна структура – фармакологічна активність». Так, приєднання гетероциклічних замісників по 5-му положенню тріазолового кільця призводить до появи антицитолітичної дії (сполуки 2.3, 2.7, 2.8, 2.29, 2.36), що свідчить про мембраностабілізуючу дію на гепатоцити. Приєднання  $\text{NH}_2$ -групи по 4-му положенню тріазолового ядра призводить до більш виразного ефекту антицитолітичної дії і впливу на активність АсАТ, АлАТ та  $\gamma$ -ГТ.

На підставі проведеного первинного фармакологічного скринінгу було відібрано сполуку 2.8, яка є 4-аміно-5-(фуран-2-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-тіолом, що найбільш істотно знижувала активність антицитолітичних ферментів АлАТ ( $p < 0,001$ ), АсАТ ( $p < 0,01$ ) та  $\gamma$ -ГТ ( $p < 0,01$ ), помірно знижувала активність ЛФ ( $p < 0,05$ ). При цьому сполука 2.8 виявила значну гіпотригліцеридемічну дію ( $p < 0,05$ ).

Наступним етапом досліджень було визначення середньоєфективної дози сполуки-лідера при пероральному введенні на підставі залежності активності сполуки від використаних доз методом пробіт-аналізу.

Для визначення середньоєфективної дози ми вивчали антицитолітичну дію за показником зниження активності АлАТ та антиоксидантної дії за рівнем ТБК-АП. Вивчення впливу сполуки 2.8 на показники антицитолітичної та антиоксидантної дії проводили на моделі гострого тетрахлорметанового гепатиту. Виявлено, що найбільш істотно сполука 2.8 знижувала активність амінотрансфераз АсАТ, АлАТ та ЛФ у дозі 1/5 від ЛД<sub>50</sub> (на 59,76 %, 77,88 % та 41,63 % відповідно) ( $p < 0,05$ ), а  $\gamma$ -ГТ у дозі 1/20 від ЛД<sub>50</sub> на 53,83 % ( $p < 0,05$ ). При дослідженні показників ПОЛ та АОС виявлено, що сполука 2.8 найбільш істотно знижувала рівень ТБК-АП у дозі 1/5 від ЛД<sub>50</sub> на 35,09 % ( $p < 0,05$ ). Проте рівень проміжних продуктів ПОЛ – ДК та ТК знижувався найбільш виразно у дозі 1/20 від ЛД<sub>50</sub> (на 62,19 % та 66,91 % відповідно) ( $p < 0,05$ ). У той же час, запаси ендogenous  $\alpha$ -ТФ зберігалися найбільш значно при застосуванні дози 1/5 від ЛД<sub>50</sub> на 124,63 % ( $p < 0,05$ ). Препарат порівняння тіотриазолін поступався сполуці 2.8 за силою зниження активності АсАТ, АлАТ,  $\gamma$ -ГТ та ЛФ (на 41,22 %, 62,50 %, 48,93 % та 15,31 % відповідно) ( $p < 0,05$ ). Так, для досліджуваної сполуки-лідера ЕД<sub>50</sub> (відносно зниження ТБК-АП) склала  $23 \pm 5,5$  мг/кг.

Звертаючи увагу на той факт, що у нашій країні розповсюджене безконтрольне самолікування комбінованими протизастудними препаратами, що містять у своєму складі парацетамол, що виявляє гепатотоксичні властивості, нами була обрана модель гострого парацетамолового гепатиту для поглибленого фармакологічного вивчення сполуки 2.8 (рис. 1). Досліджувана речовина 4-аміно-5-(фуран-2-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-тіол показала кращі показники гепатопротекторної активності та антиоксидантної дії у порівнянні з тіотриазоліном. Так, відзначалося збереження цілісності та відновлення мембран гепатоцитів (мембраностабілізуюча дія), що спостерігалася за показниками зниження активності АсАТ, АлАТ,  $\gamma$ -ГТ та ЛФ у сироватці крові (на 31,78 %, 60,00 %, 65,27 % та 52,54 % відповідно) ( $p < 0,05$ ).

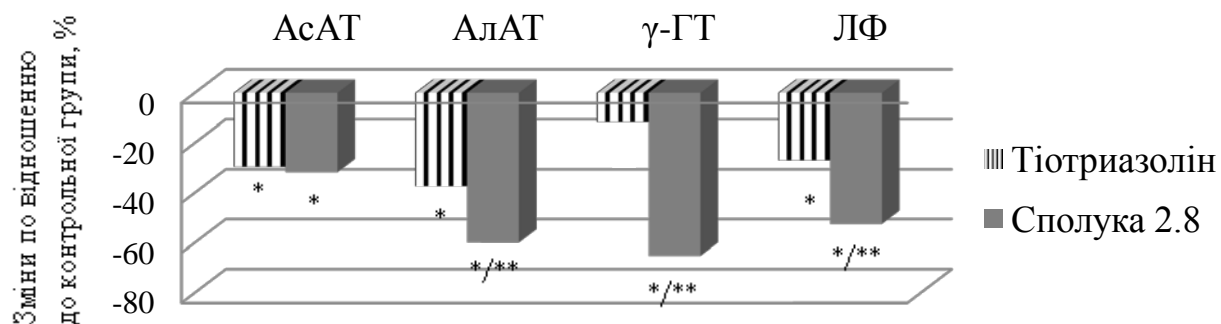


Рис.1 Вплив сполуки 2.8 на активність печінкових ферментів у сироватці крові щурів при парацетамоловому гепатиті.

Примітка. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з контрольною патологією; \*\* –  $p < 0,05$  у порівнянні з тіотриазоліном.

Встановлено, що досліджувана сполука 2.8 підвищувала функціонування системи детоксикації печінки та захищала гепатоцити від ушкодження вільними

радикалами. Про це свідчило зниження рівня кінцевого продукту ПОЛ – ТБК-АП на 30,47 % ( $p < 0,05$ ) та проміжних продуктів ПОЛ – ТК на 62,17 % ( $p < 0,05$ ).

Таким чином, гепатопротекторна та антиоксидантна дія сполуки 2.8 перевищувала ефект тіотриазоліну. Досліджувана сполука знижувала прояви окисного стресу при парацетамоловій інтоксикації печінки, діяла, можливо, як молекула антиоксидантного захисту та ефективно захищала мембрани гепатоцитів.

Засновуючись на поширеності захворювання печінки через вживання алкоголю в нашій країні нами була обрана субгостра модель алкогольного гепатиту. Досліджувана речовина показала виразну дію по захисту цілісності гепатоцитів при даній патології (рис. 2). У тварин під впливом 4-аміно-5-(фуран-2-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-тіолу знижувалось виразно явище холестазу, про що свідчило зниження активності ЛФ на 39,39 % ( $p < 0,05$ ). Активність АлАТ, АсАТ та  $\gamma$ -ГТ знижувалася істотно (на 63,98 %, 51,50 % та 62,73 % відповідно) ( $p < 0,05$ ). При цьому за показниками антицитолітичної дії сполука 2.8 перевищувала показники тіотриазоліну.

Під час експерименту відзначалося підвищення рівня загального білірубину у групі контрольної патології у порівнянні з інтактними тваринами (з  $9,27 \pm 0,471$  мкмоль/л до  $28,4 \pm 1,63$  мкмоль/л). При введенні сполуки 2.8 спостерігалось істотне зниження загального та прямого білірубину (на 63,83 % та 48,33 % відповідно) ( $p < 0,05$ ). Препарат порівняння, тіотриазолін, також істотно знижував ці показники (на 59,86 % та 55,63 % відповідно) ( $p < 0,05$ ).

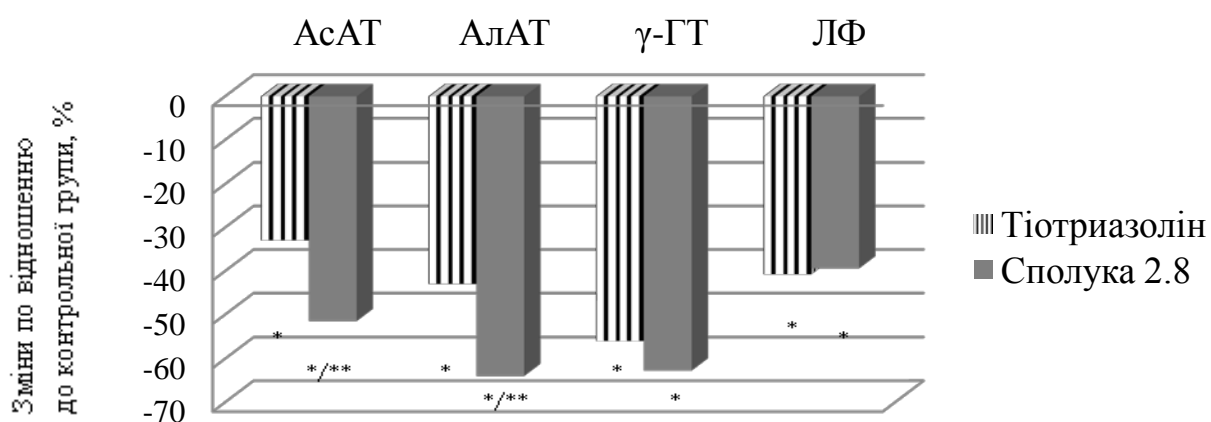


Рис.2 Вплив сполуки 2.8 на активність печінкових ферментів у сироватці крові щурів при алкогольному гепатиті.

Примітка. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з контрольною патологією; \*\* –  $p < 0,05$  у порівнянні з тіотриазоліном.

Досліджувана сполука 2.8 значно зменшувала рівень показників ПОЛ – кінцевого продукту ТБК-АП та проміжних продуктів – ДК та ТК (на 44,51 %, 64,92 % та 59,18 % відповідно) ( $p < 0,05$ ) та не поступалася еталонному препарату тіотриазоліну (на 35,39 %, 62,84 % та 48,98 % відповідно) ( $p < 0,05$ ).

При введенні 4-аміно-5-(фуран-2-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-тіолу виявлено факт збереження рівня  $\alpha$ -ТФ, що складав 131,44 % по відношенню до контролю і відповідав рівню ендogenous  $\alpha$ -ТФ у інтактних тварин ( $p < 0,05$ ).

Антиоксидантна активність сполуки 2.8 можливо пов'язана зі здатністю інгібувати утворення альдегідів, що можуть активувати зірчасті клітини печінки. Як відомо останні є основними продуцентами колагену, що може викликати перехресне зв'язування цитокератидів з формуванням тілець Маллорі та стимулювати хемотаксис нейтрофілів.

Таким чином, при застосуванні сполуки 2.8 за умов алкогольного гепатиту спостерігалось значне зниження активності антицитолітичних ферментів АсАТ, АлАТ,  $\gamma$ -ГТ, ЛФ, рівня загального та прямого білірубину, показників ПОЛ – рівня ТБК-АП, ДК, ТК, збільшення рівня ендogenous  $\alpha$ -ТФ, а також несуттєве зниження показників ліпідного обміну – рівня ЗХС та ТГ. При цьому досліджувана сполука 2.8 не поступалася препарату порівняння тіотриазоліну.

У ході візуального дослідження при алкогольному гепатиті у щурів було показано ряд змін з боку внутрішніх органів: збільшення і набряклість серця та печінки. Колір печінки темний, на поверхні у деяких тварин визначалися поодинокі крововиливи. У тварин, яким на фоні етанолу вводили сполуку 2.8, при розтині грудної та черевної порожнин внутрішні органи також були без особливостей. Серце не збільшене, явищ набряку не виявлено. Печінка візуально не відрізнялася від такої у інтактних тварин і щурів, яким вводився тіотриазолін. У тварин після введення алкоголю з подальшим застосуванням референтного препарату тіотриазоліну у терапевтичних дозах при розтині черевної та грудної порожнин внутрішні органи без особливостей, у однієї з тварин відзначалося здуття сліпої кишки. Печінка та серце візуально не відрізнялися від таких у інтактних тварин.

У тварин після алкогольної інтоксикації, часткова будова зберігалася. Однак, клітини збільшені у розмірах, у центрі часточок відзначалися явища набряку, деформація печінкових балок. Балки нерівні, викривлені, на відміну від інтактних тварин. Внутрішньочасткові жовчні протоки розширені. Центральні вени і синусоїди у центрі часточок розширені. На відміну від інтактних тварин у тканинах печінки тварин даної групи відзначалися дрібновогнищеві некрози (рис. 3 а). У щурів після введення етанолу та сполуки 2.8, наслідків алкогольної інтоксикації не виявлено. Зустрічалися поодинокі клітини з явищами гідровакуольної дистрофії. Також відновлювалася синтетична функція печінки, на що вказувала ШИК-позитивна цитоплазма, та кількість і локалізація гранул глікогену, як і у інтактних тварин. Кількість двоядерних гепатоцитів вища, ніж у тварин, які отримували алкоголь, що свідчить про активацію адаптативно-компенсаційної реакції гепатоцитів. При цьому, явищ жирової дистрофії і тілець Маллорі не знайдено, що свідчить про тимчасовий характер алкогольної дистрофії та практично повне зникнення наслідків алкогольного отруєння під впливом сполуки 2.8 (рис. 3 б). При мікроскопічному дослідженні у тварин, які на тлі введення етанолу отримували тіотриазолін встановлено, що печінкові балки рівні, не викривлені. Явища централобулярного набряку не встановлені. Центральні вени не відрізнялися від таких у інтактних тварин. Зберігалось незначне розширення печінкових синусоїдів. При імерсійній мікроскопії у клітинах печінки у обстежених тварин залишкові явища алкогольної інтоксикації у вигляді поодиноких гідровакуольно-дистрофічних змін. Клітини, що містили у цитоплазмі тілець Маллорі, не виявлені. Кількість

лімфоцитів і нейтрофілів знижувалося до – 1-2 у полі зору. У тканинах печінки виявлено значне збільшення двоядерних гепатоцитів у порівнянні з тваринами інших груп, що відображало адаптаційно-компенсаторну реакцію гепатоцитів (рис. 3 в).

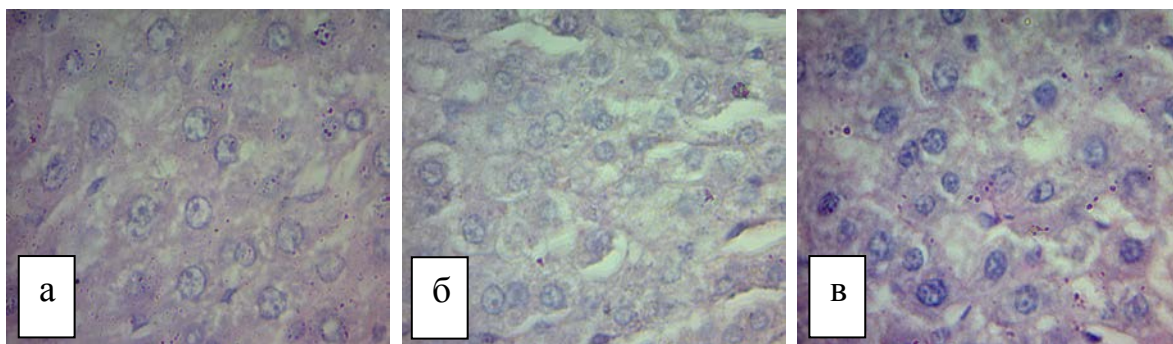


Рис. 3 Печінкова часточка, експериментальний алкогольний гепатит: а – контрольна патологія; б – контрольна патологія + сполука 2.8; в – контрольна патологія + тіотриазолін; забарвлення – гематоксилін – еозин – зб. X100.

Таким чином, у тварин, які після введення етанолу отримували сполуку 2.8, морфологічні макро- та мікроскопічні зміни після гострої інтоксикації з боку печінки практично повністю нівелювалися, що свідчить про виразну гепатопротекторну дію похідного 1,2,4-тріазолу.

Отже, вивчення гепатопротекторної активності 4-аміно-5-(фуран-2-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-тіолу та інших похідних 1,2,4-тріазолу свідчить про широкий діапазон гепатопротекторної дії цих сполук та має безперечну користь для подальшого проведення цілеспрямованого синтезу та вивчення фармакологічних ефектів у низці похідних 4-*R*-5-(алкіл-, арил-, гетерил-)-1,2,4-тріазолу з метою створення нових більш ефективних і менш токсичних лікарських засобів гепатопротекторної дії.

## ВИСНОВКИ

За даними ВООЗ на захворювання печінки страждають до 30 % населення світу, а в Україні за останні роки захворюваність на гепатити зросла на 76,6 %. Звертаючи увагу на велику кількість побічних ефектів сучасних препаратів з гепатопротекторними властивостями актуальним залишається пошук нових безпечних та високоефективних лікарських засобів з відповідною фармакологічною активністю. Спираючись на існування тіотриазоліну, який виявляє виразну гепатопротекторну активність, нами були обрані його структурні аналоги, а саме похідні 4-*R*-5-(алкіл-, арил-, гетерил-)-1,2,4-тріазолу для проведення фармакологічного скринінгу, щодо гепатопротекторної дії досліджуваних сполук. У дисертації вперше на основі залежності «хімічна структура – токсичність – фармакологічна активність» отриманні дані, які можуть бути використані для подальшого цілеспрямованого синтезу біологічно активних речовин з гепатопротекторними властивостями та рекомендовано 4-аміно-5-(фуран-2-іл)-4Н-

1,2,4-тріазол-3-тіол для поглибленого вивчення на предмет створення на його основі нового вітчизняного гепатопротекторного засобу.

1. За результатами комп'ютерного PASS прогнозування серед 37 досліджуваних сполук встановлено, що 8 речовин були здатні викликати гепатопротекторну активність з інтервалом ймовірності 53,0 % – 92,8 %. Проведений комп'ютерний прогноз гострої токсичності при різних шляхах введення за допомогою програми ГУСАР показало, що сполуки належать до III-V класів токсичності за класифікацією К.К. Сидорова (1973).

2. Результати дослідження гострої токсичності при внутрішньошлунковому шляху введення нових синтезованих 37 сполук у ряду 4-R-5- (алкіл-, арил-, гетерил-)-1,2,4-тріазолу показали, що їх ЛД<sub>50</sub> знаходяться у інтервалі 668–2430 мг/кг і речовини відносяться до IV класу токсичності за класифікацією К.К. Сидорова.

3. За даними скринінгових досліджень гепатопротекторної активності відібрано сполуку 2.8 (4-аміно-5-(фуран-2-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-тіол), яка перевищувала препарат порівняння тіотриазолін за здатністю відновлювати цілісність мембран гепатоцитів, що супроводжувалось зниженням активності АлАТ в 1,2 разу та не поступалася за показником зниження активності  $\gamma$ -ГТ на 56,87 % ( $p < 0,05$ ) та ЛФ на 24,73 % ( $p < 0,05$ ) у сироватці крові.

4. Аналіз залежності «хімічна структура – фармакологічна активність» серед 37 досліджуваних речовин показав закономірність появи гепатопротекторної дії у речовин після приєднання фуранового ядра по 5-му положенню тріазолу.

5. На моделі гострого тетрахлорметанового гепатиту середньоефективна доза сполуки 2.8 за антиоксидантної активності становила 23 мг/кг, що в 2 рази менше за середньоефективну дозу тіотриазоліну.

6. На тлі парацетамолового гепатиту доведено виражену гепатопротекторну дію сполуки 2.8, яка перевищувала препарат порівняння за рахунок зниження активності АлАТ ( $p < 0,05$ ) та  $\gamma$ -ГТ ( $p < 0,05$ ), усунення явищ холестазу (зниження активності ЛФ ( $p < 0,05$ )), пригнічення процесів ПОЛ (зниження вмісту ТБК-АП ( $p < 0,05$ ) та ДК ( $p < 0,05$ )). Останнє корелює з активацією АОС, що супроводжувалось відновлюванням ендogenous  $\alpha$ -ТФ ( $p < 0,05$ ) на рівні з препаратом порівняння.

7. Застосування сполуки 2.8 за умов алкогольного гепатиту призводило до ефективнішого за тіотриазолін відновлення гепатоцитів, що супроводжувалося більш виразним зниженням активності антицитолітичних ферментів АсАТ, АлАТ ( $p < 0,05$ ), кращим зниженням рівня ТБК-АП ( $p < 0,05$ ) та зниженням рівня ДК ( $p < 0,05$ ) та ТК ( $p < 0,05$ ). Морфологічно спостерігалось відновлення гепатоцитів, форми печінкових балок, глікогенсинтетичної функції, зменшення явищ жирової дистрофії та тілець Маллорі, посилення адаптативно-компенсаторних механізмів.

8. Отримані результати дозволяють використовувати дані залежності «хімічна структура – фармакологічна активність» для подальшого цілеспрямованого синтезу біологічно активних речовин з гепатопротекторною та гіполіпідемічною дією, рекомендувати 4-аміно-5-(фуран-2-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-тіол для подальшого доклінічного та клінічного досліджень та впровадження у медичну практику для розширення асортименту вітчизняних лікарських засобів з гепатопротекторною активністю та високим профілем безпеки.



**СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Прогнозування гострої токсичності похідних 1,2,4-тріазолу за моделями QSAR / І. М. Білай, Є. О. Михайлюк, А. Г. Каплаушенко, А. С. Гоцуля // Запорозький медичний журнал. – 2012. – № 6 (75). – С. 82–85. (Особистий внесок дисертанта: опис літературних даних, участь у виконанні експериментальної частини, аналіз та узагальнення даних, написання статті).

2. Середньоефективна доза 4-аміно-5-(фуран-2-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-тіолу при експериментальному гепатиті / І. М. Білай, Є. О. Михайлюк, В. В. Парченко, О. І. Панасенко, Є. Г. Книш // Запорозький медичний журнал. – 2014. – № 2 (83). – С. 100–102. (Особистий внесок дисертанта: опис літературних даних, участь у виконанні експериментальної частини, аналіз та узагальнення даних, написання статті).

3. Дослідження гепатопротекторної активності при експериментальному гепатиті під впливом похідних 1,2,4-тріазолу / І. М. Білай, Є. О. Михайлюк, В. В. Парченко, А. Г. Каплаушенко, О. І. Панасенко, Є. Г. Книш // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2014. – №2 (15) – С. 57–59. (Особистий внесок дисертанта: опис літературних даних, участь у виконанні експериментальної частини, аналіз та узагальнення даних, написання статті).

4. Фармакологічні дослідження 4-аміно-5-(фуран-2-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-тіолу при парацетамоловому гепатиті / І. М. Білай, Є. О. Михайлюк, В. В. Парченко, О. І. Панасенко, Є. Г. Книш // Український біофармацевтичний журнал. – 2014. – № 3 (32). – С. 60–62. (Особистий внесок дисертанта: опис літературних даних, участь у виконанні експериментальної частини, аналіз та узагальнення даних, написання статті).

5. Влияние 4-амино-5-(фуран-2-ил)-4Н-1,2,4-триазол-3-тиола на показатели гепатопротекторной активности при алкогольном гепатите у крыс / И. М. Белаи, Е. О. Михайлюк, В. В. Парченко, А. И. Панасенко, Е. Г. Кныш // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 132–137. (Особистий внесок дисертанта: опис літературних даних, участь у виконанні експериментальної частини, аналіз та узагальнення даних, написання статті).

6. Дослідження гепатопротекторної активності похідних 1,2,4-тріазолу на моделі токсичного ураження печінки / І. М. Білай, Є. О. Михайлюк, А. Г. Каплаушенко, Т. С. Брітанова, А. І. Панасенко, Є. Г. Книш // Український медичний альманах. – 2014. – Т. 17, № 3. – С. 11–13. (Дисертантом проведено літературний аналіз за темою, самостійно виконано частину експерименту, проведено аналіз і узагальнено отримані результати, підготовка статті до друку).

7. Пат. на корисну модель № 87589, Україна, МПК С07D 473/12. Морфолін 2-(4-(2-метоксіфеніл)-5-(піридин-4-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетат, який виявляє гепатопротекторну активність / Є. О. Михайлюк, І. М. Білай, А. Г. Каплаушенко, О. І. Панасенко, Є. Г. Книш; заявник та патентовласник Запорізький державний медичний університет. – № u 2013 11080, заявл. 17.09.2013; опубл. 10.02.2014, бюл. № 3 (Особистий внесок дисертанта: проведення патентного пошуку, участь у

виконанні експериментальної частини, аналіз та узагальнення результатів, оформлення патенту).

8. Михайлюк Є. О. Дія похідних 1,2,4-тріазолу при експериментальному гепатиті / Є. О. Михайлюк, Є. С. Пругло, І. М. Білай // Фармакологія та лікарська токсикологія : матеріали IV Національного з'їзду Фармакологів України (м. Київ, 10-12 жовтня, 2011 р.). – К., 2011. – № 5 (24). – С. 212.

9. Михайлюк Є. О. Вплив похідних 1,2,4-тріазолу на активність аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази при експериментальному гепатиті / Є. О. Михайлюк, І. М. Білай // Актуальні питання створення нових лікарських засобів : матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів та молодих вчених (м. Харків, 19-20 квітня, 2012 р.). – Х. : Вид-во НФаУ, 2012. – Т. II. – С. 394.

10. Білай І. М. Фармакологічні властивості деяких солей похідних 1,2,4-тріазолу при експериментальному токсичному гепатиті / І. М. Білай, Є. О. Михайлюк // Медицина та фармація XXI століття – крок у майбутнє : матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2012. – № 9 (додаток). – С. 175-176.

11. Михайлюк Є. О. Дослідження фармакологічної дії похідних 4-(алкіл,-арил,-гетерил)-5-(алкіл,-арил,-гетерил)-1,2,4-тріазолу при модульованому токсичному гепатиті / Є. О. Михайлюк, І. М. Білай, А. Г. Каплаушенко, В. В. Парченко, Р. О. Щербіна, А. А. Сафонов, О. І. Панасенко // Матеріали XVII Міжнародного медичного конгресу студентів і молодих вчених (м. Тернопіль, 22-24 квітня, 2013). – Тернопіль, 2013. – С. 316.

12. Прогнозування фармакологічних активностей похідних 4-(алкіл,-арил,-гетерил)-(алкіл,-арил,-гетерил)-1,2,4-тріазолу / І. М. Білай, Є. О. Михайлюк, М. П. Красько, Ю. Г. Резніченко // Український медичний альманах. – Луганськ, 2013. – Т. 16, № 1 (додаток). – С. 179.

13. Прогнозування гострої токсичності похідних 1,2,4-тріазолу у програмі GUSAR ONLINE / І. М. Білай, Є. О. Михайлюк, А. Г. Каплаушенко, А. С. Гоцуля // Клінічна фармація: 20 років в Україні : матеріали Національного конгресу (м. Харків, 21-22 берез. 2013 р.). – Харків, 2013. – С. 25.

14. Білай І. М. Фармакологічні властивості 4-аміно-5-(фуран-2-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-тіолу при парацетамоловому гепатиті / І. М. Білай, Є. О. Михайлюк // Клінічна фармакологія та фармакотерапія захворювань у світлі доказової медицини : матеріали VII Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю з клінічної фармакології (м. Вінниця, 20-21 листопада, 2013 р.). – Вінниця, 2013. – С. 66–67.

15. Білай І. М. Спосіб лікування алкогольного гепатиту у щурів (експериментальні дослідження) : інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я № 160 – 2014 / І. М. Білай, В. В. Парченко, Є. О. Михайлюк / Укрмедпатентінформ МОЗ України. – К., 2014. – 4 с. (Особистий внесок дисертанта: приймав участь у літературному пошуку, виконанні експерименту, підготовці інформаційного листа до видання).

## АНОТАЦІЯ

**Михайлюк Є.О. Фармакологічна активність нових похідних 4-R-5-(алкіл-, арил-, гетерил-)-1,2,4-тріазолу при експериментальному токсичному гепатиті. – На правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія. – Національний фармацевтичний університет МОЗ України, Харків, 2015.

Дисертація присвячена вивченню гепатопротекторних властивостей нових похідних 4-R-5-(алкіл-, арил-, гетерил-)-1,2,4-тріазолу в умовах експерименту з трьома типами моделювання гострого гепатиту.

Встановлено, що досліджувані похідні 1,2,4-тріазолу мають гепатопротекторну активність.

У досліджах *in vivo* була виявлена сполука 2.8 – 4-аміно-5-(фуран-2-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-тіол, що за виразністю гепатопротекторної та антиоксидантної дії перевищувала препарат порівняння – тіотриазолін. У результаті аналізу «структура – фармакологічна дія» було встановлено, що наявність та сила гепатопротекторної та антиоксидантної дії залежить від характеру замісника по 1,2,4-тріазоловому ядру молекули. Визначена гостра токсичність 4-аміно-5-(фуран-2-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-тіолу (ЛД<sub>50</sub> 1311,48 мг/кг при внутрішньоочеревинному введенні).

Встановлено, що досліджені речовини мають гепатопротекторну та антиоксидантну активності: за активністю у лікувально-профілактичному режимі вони не поступаються тіотриазоліну.

Одержані результати дослідів дають підстави для розгляду 4-аміно-5-(фуран-2-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-тіолу як сполуки для поглибленого доклінічного дослідження з метою створення на його основі потенційного гепатопротекторного засобу.

*Ключові слова:* фармакологічний скринінг, токсичний гепатит, гепатопротекторна активність, антиоксидантна активність, похідні 1,2,4-тріазолу.

## АННОТАЦИЯ

**Михайлюк Е.О. Фармакологическая активность новых производных 4-R-5-(алкил-, арил-, гетерил-)-1,2,4-триазола при экспериментальном токсическом гепатите. – На правах рукописи.**

Диссертация на соискание научной степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.03.05 – фармакология. – Национальный фармацевтический университет МЗ Украины, Харьков, 2015.

За последние годы в Украине заболеваемость гепатитами выросла в 2,2 раза, как следствие это привело к увеличению смертности от данной патологии. Не смотря на распространенность лекарственных средств с гепатопротекторными свойствами, они не лишены побочных эффектов. Исходя из вышесказанного актуальным остается поиск новых безопасных и высокоэффективных средств с гепатопротекторной активностью.

Диссертация посвящена скрининговому исследованию новых производных 1,2,4-триазола с целью поиска потенциального гепатопротекторного средства.

Результаты исследований обработаны современными статистическими методами анализа на персональном компьютере с использованием стандартного пакета программ Microsoft Office 2007 и «Statistica for Windows 6.0» (StatSoft Inc., № АХХR712D833214FAN5). Рассчитаны средние арифметические ( $M$ ) и стандартные отклонения средней ( $\pm m$ ). Достоверность межгрупповых отличий рассчитывали при помощи параметрического  $t$ -критерия Стьюдента.

Осуществлен прогноз биологической активности производных 1,2,4-триазола с помощью компьютерной программы PASS, который показал целесообразность поиска среди исследуемых соединений с гепатопротекторной активностью.

В результате проведенных исследований было установлено, что все отобранные соединения по величине  $LD_{50}$  (668 и 2430 мг/кг) являются малотоксическими по классификации Сидорова К.К.

По результатам проведенных экспериментальных исследований *in vivo* установлено, что производные 1,2,4-триазола на модели острого тетрахлорметанового гепатита проявляют гепатопротекторную активность.

Анализ зависимости «химическая структура – фармакологическая активность» среди 37 исследуемых веществ показал, что наличие и выраженность гепатопротекторной и гипополидемической активности зависят от функциональных заместителей по  $N_4$  и  $C_5$  положениям ядра 1,2,4-триазола.

Проведено доклиническое изучение наиболее перспективного соединения – 4-амино-5-(фуран-2-ил)-4Н-1,2,4-триазол-3-тиола в качестве гепатопротекторного и антиоксидантного средства. Определена среднеэффективная доза (23,21 мг/кг), изучена острая токсичность ( $LD_{50}$  1311,48 мг/кг при внутрибрюшинном введении) и эффективность на моделях острого тетрахлорметанового, парацетамолового и подострого алкогольного гепатитов. Исследования показали, что применение 4-амино-5-(фуран-2-ил)-4Н-1,2,4-триазол-3-тиола приводило к снижению активности аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, щелочной фосфатазы,  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы, уровня общего и прямого билирубина.

Под влиянием 4-амино-5-(фуран-2-ил)-4Н-1,2,4-триазол-3-тиола снижался уровень продуктов перекисного окисления липидов, индуцированного экспериментальным гепатитом. Уменьшалось содержание основных продуктов свободнорадикального окисления – диеновых и триеновых конъюгатов, ТБК - активных продуктов. Восстанавливался уровень эндогенного  $\alpha$ -токоферола.

По эффективности влияния на показатели гепатопротекторного действия 4-амино-5-(фуран-2-ил)-4Н-1,2,4-триазол-3-тиол не уступал препарату сравнения тиотриазолину.

Таким образом, применение 4-амино-5-(фуран-2-ил)-4Н-1,2,4-триазол-3-тиола при экспериментальном токсическом гепатите приводило к восстановлению целостности мембран гепатоцитов и при этом положительно влияло на антиоксидантную систему. По видимому, гепатопротекторный эффект этого вещества связан, прежде всего, с антиоксидантной активностью.

Применение соединения 2.8 в условиях алкогольного гепатита приводило к более эффективному по сравнению с тиотриазолином восстановлению гепатоцитов, что сопровождалось более выраженным снижением активности антицитолітичних ферментов АсАТ, АлАТ ( $p < 0,05$ ), лучшим снижением уровня ТБК-АП ( $p < 0,05$ ) и снижением уровня ДК ( $p < 0,05$ ) и ТК ( $p < 0,05$ ). Морфологически наблюдалось восстановление гепатоцитов, формы печеночных балок, гликогенсинтетической функции, уменьшению явлений жировой дистрофии и телец Маллори, усиление адаптативно-компенсаторных механизмов.

Полученные результаты позволяют использовать данные зависимости «химическая структура – фармакологическая активность» для дальнейшего целенаправленного синтеза биологически активных веществ с гепатопротекторным и гипополидемическим действием, рекомендовать 4-амино-5-(фуран-2-ил)-4Н-1,2,4-триазол-3-тиол для дальнейшего доклинического и клинического исследований и внедрения в медицинскую практику для расширения ассортимента отечественных лекарственных препаратов с гепатопротекторной активностью и высоким профилем безопасности.

*Ключевые слова:* фармакологический скрининг, токсический гепатит, гепатопротекторная активность, антиоксидантная активность, производные 1,2,4-триазола.

## SUMMARY

**Mihayluk E.O. Pharmacological activity of new derivatives of 4-R-5-(alkyl-, aryl-, heteryl-)-1,2,4-triazole under experimental toxic hepatitis. – As the manuscript.**

Thesis for reaching the scientific degree of the candidate of pharmaceutical sciences on speciality – 14.03.05 – pharmacology. – National University of Pharmacy Ministry of Health Care, Kharkiv, 2015.

The thesis is devoted to the study of hepatoprotective properties of derivatives of 4-R-5-(alkyl-, aryl-, heteryl-)-1,2,4-triazole under experimental toxic hepatitis.

It was established that the investigated derivatives of 1,2,4-triazole have hepatoprotective activity.

In vivo experiments showed that the strength hepatoprotective activity greater than pharmacological standards – thiotriazolin. The analysis of "structure-action" has been established that the presence and strength of the hepatoprotective activity depends on the nature of the deputy for a 1,2,4-triazole core of the molecule. Determined the acute toxicity of 4-amino-5-(furan-2-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol ( $LD_{50}$  1311,48 mg / kg intragastric injection).

It is established that the investigated compounds have hepatoprotective activity: the activity at a health care regime do not differ from the effect of thiotriazolin.

Experimental data give grounds to consider 4-amino-5-(furan-2-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol for advanced preclinical studies to create on its basis a potential hepatoprotective agent.

*Keywords:* pharmacological screening, toxic hepatitis, hepatoprotective activity, antioxidant activity, derivatives of 1,2,4-triazole.

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ**

АлАТ – аланінамінотрансфераза;  
АМН – академія медичних наук;  
АсАТ – аспартатамінотрансфераза;  
ВООЗ – всесвітня організація охорони здоров'я;  
ДЕЦ – Державний експертний центр;  
ДЗ – державний заклад;  
ДК – дієнові кон'югати;  
ЕД – ефективна доза;  
ЗХС – загальний холестерин;  
ІЧ – інфрачервоний;  
ЛД – летальна доза;  
ЛФ – лужна фосфотаза;  
МОЗ – міністерство охорони здоров'я;  
ПМР – протонний магнітний резонанс;  
ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів;  
ТБК-АП – активні продукти з тіобарбітуровою кислотою;  
ТГ – тригліцериди;  
ТК – трієнові кон'югати;  
УФ – ультрафіолетовий;  
ХС – холестерол;  
 $\alpha$  – ТФ –  $\alpha$ -токоферол;  
 $\gamma$ -ГТ –  $\gamma$ -глутамілтранспептидаза;  
GLP – good laboratory practice;  
PASS – Prediction of Activity Spectra for Substances.