

С. А. Демченко, Л. С. Бобкова, О.Ю. Баглай,
А.К. Вороніна, А. М. Демченко

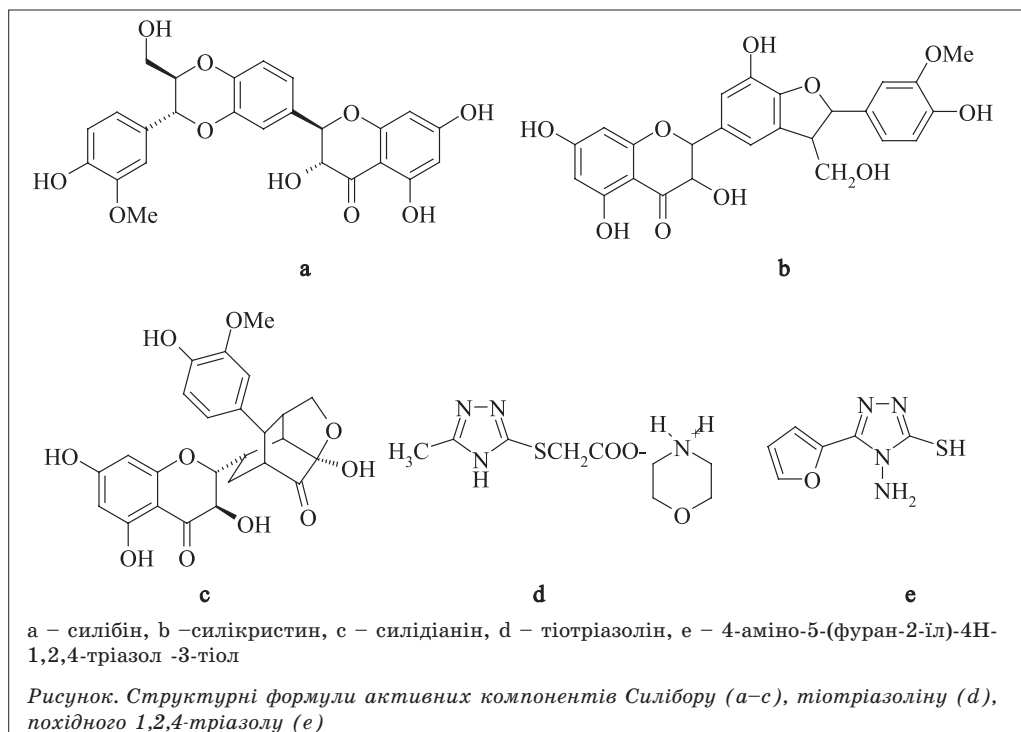
Гепатопротекторна активність похідних 5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-тріазациклопента[сd] азулену

Державна установа «Інститут фармакології та токсикології
Національної академії медичних наук України», м. Київ

Ключові слова: гепатопротекторна активність, модель парацетамолового гепатиту, похідні 5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-тріазациклопента[сd]азулену

Сьогодні число хворих на гостру печінкову недостатність медикаментозного походження зростає, насамперед, за рахунок поширеного самолікування та безконтрольного застосування парацетамолу [1]. За гострих та хронічних гепатитів різного генезу високим позитивним ефектом характеризується Антраль – препарат на основі координаційної сполуки алюмінію з амінокарбоною кислотою [2]. Відомо, що гепатопротекторна активність притаманна тіотріазоліну та препарату рослинного походження Силі-

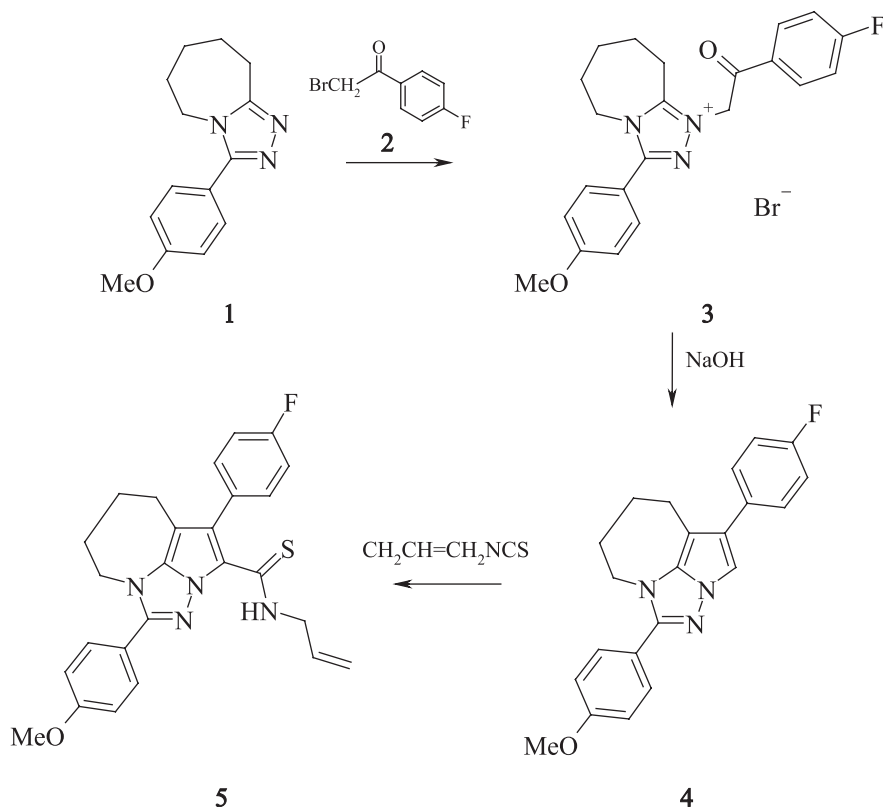
бору, активні компоненти якого представлені силімарином, а саме ізомерами силібіним (а), силікрістином (b) та силідіаніном (с) (рисунок). Гепатопротекторна активність похідного тріазолу – (4-аміно-5-(фуран-2-іл)4Н-1,2,4-тріазол-3-тіолу) вивчена на моделі парацетамолового гепатиту [3]. Нашу увагу привернули похідні 5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-тріазациклопента[сd]азулену, а саме 1-(4¹-метоксифеніл)-4-(4²-флуорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-тріазациклопента[сd]азулен (4) та N-алілтіоамід-1-(4¹-метоксифеніл)-4-(4²-флуорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2а,4а-діазациклопента [сd]азулен-2-карбонової кислоти (5) (схема).



Мета дослідження – вивчити гепатопротекторну активність похідних 5, 6, 7, 8-тетрагідро-2, 2а, 8а-тріазаціклопента[сd]азулену на етапі первинного фармакологічного скринінгу.

Матеріали та методи. Досліджувані сполуки 1-(4¹-метоксифеніл)-4-(4²-флуорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-

тріазаціклопента[сd]азулен (4) та N-алілтїоамід-1-(4¹-метоксифеніл)-4-(4²-флуорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2а,4а-діазаціклопента[сd]азулен-2-карбонової кислоти (5) були синтезовані у відділі медичної хімії ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» за схемою:



Для первинної оцінки гепатопротекторної активності синтезованих сполук було вибрано модель медикаментозного гепатиту, викликаного парацетамолом [4]. Оскільки парацетамол-індуковане ушкодження печінки добре вивчене та швидко відтворюється за лабораторних умов, дана модель стала стандартною в фармакології й токсикології. Зокрема, передозування парацетамолу в гризунів часто використовують для дослідження гепатопротекторного потенціалу лікарських рослин. Миші більш чутливі до гепатотоксичної дії парацетамолу порівняно зі щурами [5]. З метою вивчення гепатопротекторної активності досліджуваних сполук моделювали парацетамол-індукований гепатит у мишей [6].

До початку даного дослідження Комітет з біоетики ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» розглянув і схвалив процедури, пов'язані з утриманням тварин та їхнім використанням в експерименті. Досліди проводили на ставовозрілих білих мишах-самицях з масою тіла 18–22 г, розведення ПП «Біомодельсервіс». Тваринам згодовували *ad libitum* стандартний раціон для лабораторних тварин. Воду з міського водогону (після оберненого осмосу та стерилізації УФ-випромінюванням) подавали *ad libitum*. Як підстилку використовували тирсу вільхи (*Alnus glutinosa*), яку попередньо стерилізували в автоклаві. У кімнатах для утримання тварин підтримували

наступні умови: температуру – 20–24 °С, вологість – 30–70 %, цикл освітлення – 12 год світло/12 год темрява.

Для відтворення моделі медикаментозного гепатиту одноразово внутрішньошлунково вводили парацетамол у дозі 300 мг/кг маси тіла у вигляді суспензії в 2 % розчині крохмального гелю з розрахунку 0,5 мл розчину на 20 г маси тіла тварини. Досліджувані речовини – похідні 5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-тріазациклопента[сd]азулену (4 та 5 відповідно) вводили за 1 год до введення парацетамолу в дозі 25 мг/кг маси тіла.

Для експерименту було відібрано 28 тварин, яких було розподілено на чотири групи по 7 тварин у кожній: перша група – інтактні тварини; друга група (контроль – модель медикаментозного гепатиту); тваринам третьої та четвертої груп за 1 год до введення парацетамолу вводили досліджувані речовини – похідні 5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-тріазациклопента[сd]азулену (4 та 5 відповідно). Через 18 год після введення парацетамолу в тварин під легким ефірним наркозом брали зразки крові для біохімічних досліджень, потім здійснювали евтаназію шляхом цервікальної дислокації.

Біохімічні показники сироватки крові були досліджені у день отримання за допомогою автоматичного біохімічного аналізатора Prestige 24і, Японія. У сироватці досліджували активність аланінамінотрансферази (АлАТ), аспартатамінотрансферази (АсАТ), лужної фосфатази (ЛФ) та гама-глутамат-амінотрансферази (ГГТ) з використанням тест-систем фірми Cormay, Польща.

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням MS Excel. Дані наведені як середнє значення ± похибка середнього значення ($M \pm m$). Аналіз вірогідності результатів експерименту проводили з використанням t-критерію Стьюдента. Різницю між показниками досліду та контролю вважали статистично вірогідною за значення $p < 0,05$.

3-(4¹-Метоксифеніл)-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-[1,2,4]тріазоло[4,3-а]азепін 1 одержано конденсацією 2-метокси-3,4,5,6-тетрагідро-7Н-азепіну з гідратом 4-метоксибензойної кислоти та

подальшою циклізацією проміжного продукту за методом [7].

Спектри ПМР були зареєстровані на спектрометрі Bruker DAX500, робоча частота 500,13 МГц, внутрішній стандарт ТМС. Контроль за чистотою синтезованих сполук здійснювали за допомогою ТПХ на пластинках Silufol UV-254 у системі хлороформ–метанол 9:1.

1-(4¹-Метоксифеніл)-4-(4²-флуорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-тріазациклопента[сd]азулен (4). Суміш 2,43 г (0,01 моль) 3-(4¹-метоксифеніл)-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-[1,2,4]тріазоло[4,3-а]азепіну (1) та 2,17 г (0,01 моль) 4-флуорофенацилброміду 2 кип'ятили в 80 мл етилацетату 1 год. Після охолодження розчинник декантували, залишок – четвертинну сіль 3 – промивали етером, доливали 40 мл 5 % розчину NaOH і кип'ятили реакційну суміш 3 год. Після охолодження осад відфільтрували, промивали водою, сушили. Очищали кристалізацією з бензену. Вихід 1,48 г (41 %). $T_{пл.} = 233-235$ °С. Знайдено, %: N 11,6, $C_{22}H_{20}FN_3O$. Розраховано, %: N 11,4. ЯМР ¹H (δ, м.ч., DMSO-d₆): 2,01 (м, 4Н, 6,7-CH₂CH₂), 2,81 (м, 2Н, 5-CH₂), 3,85 (с, 3Н, OCH₃), 4,06 (м, 2Н, 8-CH₂), 7,07 та 7,71 (д-д, 4Н, C₆H₄), 7,14 (с, 1Н, 3-Н), 7,09–7,48 (м, 4Н, C₆H₄).

N-Алілтіоамід-1-(4¹-метоксифеніл)-4-(4²-флуорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2а,4а-діазациклопента[сd]азулен-2-карбонової кислоти (5). До розчину 1,81 г (0,005 моль) сполуки (4) у 25 мл сухого бензену при перемішуванні додавали 0,496 г (0,005 моль) алілізотіоціанату та кип'ятили протягом 1 год. Розчин охолоджували, осад фільтрували, сушили, очищали кристалізацією з бензену. Вихід 1,80 г (78 %). $T_{пл.} = 216-217$ °С. Знайдено, %: N 12,5, $C_{26}H_{25}FN_4OS$. Розраховано, %: N 12,2. ЯМР ¹H (δ, м.ч., DMSO-d₆): 1,97–2,12 (м, 4Н, 6,7-CH₂CH₂), 2,82 (м, 2Н, 5-CH₂), 3,80 (с, 3Н, OCH₃), 4,20 (м, 2Н, 8-CH₂), 4,41 (м, 2Н, CH₂-CH=CH₂), 5,16–5,37 (м, 2Н, CH₂-CH=CH₂), 6,02 (м, 1Н, CH₂-CH=CH₂), 7,01–7,27 (м, 4Н, C₆H₄), 7,09 та 7,72 (д-д, 4Н, C₆H₄), 9,35 (т, 1Н, NH).

Результати та їх обговорення. Аналіз показників загального фізичного стану

Біохімічні показники сироватки крові мишей самиць за моделлю парацетамол-індукованого гепатиту за введення досліджуваних сполук ($M \pm m, n \geq 5$)

Експериментальна група	АлАТ, МО/л	АсАТ, МО/л	ЛФ, МО/л	ГГТ, МО/л
Інтактні	60,3 ± 4,7	320,8 ± 34,7	264,6 ± 22,5	4,65 ± 1,53
Контроль	378,2 ± 84,8*	609,3 ± 84,5	434,4 ± 56,8*	6,70 ± 0,78
Сполука 4	180,7 ± 104,3	458,0 ± 49,2	275,2 ± 23,9**	7,02 ± 1,01
Сполука 5	145,3 ± 78,1	454,5 ± 70,5	305,2 ± 43,4	5,28 ± 0,30

Примітка. *Вірогідні зміни порівняно з інтактними тваринами; **вірогідні зміни порівняно з контролем.

тварин показав, що після введення парацетамолу в тварин контрольної групи зафіксовано виражене зниження спонтанної рухової активності, яке зберігалось протягом 14 год і повністю так і не відновилось. У тварин третьої і четвертої груп, яким перед введенням парацетамолу застосовували сполуки 4 та 5, теж спостерігали зниження спонтанної рухової активності, але в значно меншій мірі, і вона повністю відновилась через 4 год.

У таблиці наведено дані дослідження біохімічних показників сироватки крові мишей. У тварин контрольної групи зросла активність амінотрансфераз АлАТ і АсАТ у 6,3 та 1,9 разу відповідно порівняно з показниками в інтактних тварин. Також у сироватці крові мишей даної групи збільшилась активність ЛФ на 55 % і активність ГГТ на 44 %. Це свідчить про активацію маркерних ферментів цитолізу за введення парацетамолу й некрозодистрофічні порушення у гепатоцитах.

На експериментальній моделі медикаментозного гепатиту вивчали гепатопротекторні властивості сполук 4 та 5 у лікувально-профілактичному режимі. У разі введення сполуки 4 активність ЛФ була вірогідно меншою порівняно з контрольною групою (таблиця), тобто застосування даної сполуки повністю запобігало зростанню активності ЛФ, і даний показник залишився на рівні інтактної групи. Також під впливом сполуки 4 відмічали тенденцію до зниження активності АлАТ і АсАТ на 52 та 25 % відповідно порівняно з показ-

никами контрольної групи. Введення сполуки 4 жодним чином не вплинуло на активність ГГТ у сироватці крові тварин.

У разі введення сполуки 5 вірогідних змін активності досліджуваних ферментів не зареєстровано, проте також спостерігали тенденцію до зниження даних показників відносно тварин контрольної групи. Так, активність АлАТ знизилася на 62 %, АсАТ і ГГТ – на 25 %, а ЛФ – на 30 % (таблиця).

Висновки

1. Досліджувані сполуки 1-(4¹-метоксифеніл)-4-(4²-флуорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-тріаза-циклопента[сd]азулен (4) та N-алілтіоамід-1-(4¹-метоксифеніл)-4-(4²-флуорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2а,4а-діазаціклопента[сd]азулен-2-карбонової кислоти (5) на експериментальній моделі медикаментозного гепатиту в лікувально-профілактичному режимі проявили гепатопротекторну активність на рівні тенденції щодо зниження активності АлАТ і АсАТ.
2. Застосування сполуки 4 повністю запобігало зростанню активності ЛФ у сироватці крові тварин порівняно з відповідними показниками в групі контрольної патології (вірогідне зменшення порівняно з контрольною групою).
3. Отримані дані створюють передумови для подальшого вивчення гепатопротекторної активності похідних 5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-тріазаціклопента[сd]азулену.

1. Голубчиков М. В. Статистичний огляд захворюваності населення України на хвороби печінки та жовчовивідних шляхів / М. В. Голубчиков // Сучасна гастроентерологія і гепатологія. – 2000. – № 2. – С. 53–55.

2. Фролов В. М. Досвід і перспективи застосування нового препарату Антраль у клінічній практиці / В. М. Фролов, Г. С. Григор'єва, І. В. Лоскутова // Фармакологічний вісник. – 2000. – № 2. – С. 2–5.

3. Исследование фармакологической активности 4-амино-5-(фуран-2-ил)4Н-1,2,4-триазол-3-тиола при парацетамоловом гепатите / И. М. Белай, Е. О. Михайлюк, В. В. Парченко [и др.] // Вестник ВГМУ. – 2013. – Т. 12, № 4. – С. 114–117.
4. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації; за ред. О. В. Стефанова. – Київ : Авіцена, 2001. – 528 с.
5. Acetaminophen-induced Liver Injury in Rats and Mice: Comparison of Protein Adducts, Mitochondrial Dysfunction, and Oxidative Stress in the Mechanism of Toxicity / M. R. McGill, C. D. Williams, Y. Xie [et al.] // Toxicol Appl Pharmacol. – 2012. – V. 264, № 3. – P. 387–394.
6. Kelava T. Influence of small doses of various drug vehicles on acetaminophen-induced liver injury / T. Kelava, I. Cavar, F. Culo // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 2010. – V. 88. – P. 960–967.
7. Petersen S. Reaktionen cyclischer lactimäther mit acylierten hydrazinderivaten / S. Petersen, E. Tietze // Chem. Ber. – 1957. – V. 90, Is. 6. – P. 909–921.

С. А. Демченко, Л. С. Бобкова, О. Ю. Баглай, А. К. Вороніна, А. М. Демченко
Гепатопротекторна активність похідних 5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулену

Мета дослідження – вивчити гепатопротекторну активність похідних 5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулену на етапі первинного фармакологічного скринінгу.

Оцінено гепатопротекторні властивості похідних 5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулену на експериментальній моделі медикаментозного гепатиту в лікувально-профілактичному режимі. Показано, що досліджувані сполуки знижували активність АлАТ до 52–62 % та АсАТ на 25 %, а сполука 5 знизила активність ЛФ на 30 % порівняно з відповідними показниками в групі контрольної патології. У разі застосування сполуки 4 активність ЛФ залишилась на рівні інтактних тварин. Отримані результати вказують на перспективність похідних 5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулену як сполук з потенційною гепатопротекторною дією.

Ключові слова: гепатопротекторна активність, модель медикаментозного гепатиту, похідні 5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулену

С. А. Демченко, Л. С. Бобкова, А. Ю. Баглай, А. К. Воронина, А. М. Демченко
Гепатопротекторная активность производных 5,6,7,8-тетрагидро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулена

Цель исследования – изучить гепатопротекторную активность производных 5,6,7,8-тетрагидро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулена на этапе первичного фармакологического скрининга.

Оценены гепатопротекторные свойства производных 5,6,7,8-тетрагидро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулена на экспериментальной модели медикаментозного гепатита в лечебно-профилактическом режиме. Показано, что исследуемые соединения снижали активность АлАТ на 52–62 % и АсАТ на 25 %, а соединение 5 снижало активность ЩФ на 30 % по сравнению с соответствующими показателями в группе контрольной патологии. При применении соединения 4 активность ЩФ оставалась на уровне интактных животных. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности производных 5,6,7,8-тетрагидро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулена как соединений с потенциальной гепатопротекторной активностью.

Ключевые слова: гепатопротекторная активность, модель медикаментозного гепатита, производные 5,6,7,8-тетрагидро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулена

S. A. Demchenko, L. S. Bobkova, A. Y. Bahlai, A. K. Voronina, A. M. Demchenko
Hepatoprotective activity of derivatives of 5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[сd]azulene

The aim of research was to investigate the hepatoprotective activity of the derivatives of 5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[сd]azulene at the stage of primary pharmacological screening. The hepatoprotective properties of the derivatives of 5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[сd]azulene on the experimental model of drug-induced hepatitis in the treatment-and-prophylactic regimen were estimated. It was shown that the tested compounds decreased the activity of ALT (52–62 %) and AST on 25 %, tested compounds 5 decreased ALP on 30 % in comparison with the corresponding parameters in the control pathology group. When use the tested compound 4, the activity of alkaline phosphatase was at the level of intact animals. The results obtained indicate the prospect of the derivatives of 5,6,7,8-tetrahydro-2,2a, 8a-triazacyclopenta[сd]azulene as compounds with potential hepatoprotective activity.

Key words: hepatoprotective activity, model of drug-induced hepatitis, 5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[сd]azulene derivatives

Надійшла: 1 серпня 2017 р.

Контактна особа: Баглай Олександр Юрійович, провідний інженер, відділ медичної хімії, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Ежена Потье, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 44 456 94 18. Електронна пошта: demch7758@ukr.net