© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

ВЛИЯНИЕ 4-АМИНО-5-(ФУРАН-2-ИЛ)-4Н-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ТИОЛА НА ПОКАЗАТЕЛИ ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ ПРИ АЛКОГОЛЬНОМ ГЕПАТИТЕ У КРЫС

БЕЛАЙ И.М., МИХАЙЛЮК Е.О., ПАРЧЕНКО В.В., ПАНАСЕНКО А.И., КНЫШ Е.Г.

УЭФ ФПО «Запорожский государственный медицинский университет», Украина

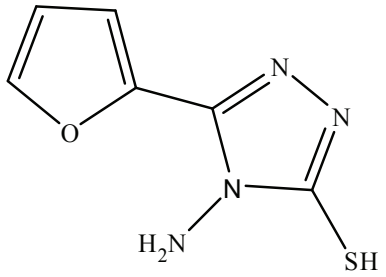
Резюме.
В странах СНГ наблюдается большое количество гепатитов алкогольной этиологии по случаю распространенности алкоголизма в масштабах национальной эпидемии. Кроме того, известно, что именно печень является органом, который в первую очередь страдает от воздействия алкоголя. В связи с этим большой интерес представляет подбор эффективных гепатопротекторов при алкогольном гепатите. На основании проведенного первичного фармакологического скрининга было отобрано соединение 2.8, которое представляет собой 4-амино-5-(фуран-2-ил)-4Н-1,2,4-триазол-3-тиол.
Целью данной работы явилось исследование гепатопротекторного действия 4-амино-5-(фуран-2-ил)-4Н-1,2,4-триазол-3-тиола при алкогольном гепатите. Нами было изучено его антицитолитическое и антиоксидантное действие при алкогольной модели гепатита.
Для доклинического изучения субстанция данного вещества наработана в лаборатории органического синтеза кафедры токсикологической и неорганической химии Запорожского государственного медицинского университета.
Гепатит моделировался внутрижелудочным введением 40% раствора этилового спирта в дозе 7 мл/кг 1 раз в сутки в течение 7 недели. Исследуемое вещество и лекарственное средство сравнения тиотриазолин вводили за 1 час до и через 2 часа после введения этанола. Забор крови и тканей печени проводили через 72 часа после последнего введения алкоголя. Лекарственным средством сравнения являлся тиотриазолин, который вводился внутрижелудочно с помощью зонда в дозе 50 мг/кг.
Полученные данные показали большую эффективность исследуемого вещества по сравнению с референтным лекарственным средством тиотриазолином.
Ключевые слова: фармакологическое действие, алкогольный гепатит, производные триазола.

Abstract.
In the CIS countries the consequences of alcohol-induced hepatitis are getting more and more serious and acute, alcoholism becoming a national epidemic. It is the liver that primarily suffers from the impact of alcoholism both acute and chronic. In this connection the investigation of effective hepatoprotectors in alcoholic hepatitis is of great interest. On the basis of primary pharmacological screening the compound 2.8, which is 4-amino-5-(furan-2-il)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol was selected.
The aim of this work was to research hepatoprotective activity of 4-amino-5-(furan-2-il)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol in alcoholic hepatitis. Its anticytolytic and antioxidant effects in the alcoholic model of hepatitis were studied by us. As an object of the present research 4-amino-5-(furan-2-il)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol was used, it was created at the department of toxicological and inorganic chemistry of Zaporozhe State Medical University.
Experiments were performed on white rats. The tested substance was administered to rats in a health care mode (parallel with the formation of experimental alcoholic hepatitis). Experimental alcoholic hepatitis was modelled by the introduction of 40% solution of ethanol intragastrically in the dose of 7 ml/kg once a day during a week. The tested compound and comparison medicinal agent thiotriazolin were introduced 1 hour before and 2 hours after the administration of ethanol. After 72 hours blood and liver tissues were taken.
The obtained data showed greater effectiveness of the tested substance compared to the reference drug, i.e. thiotriazolin.
Key words: pharmacologic action, alcoholic hepatitis, triazole derivatives.

Ни для кого не секрет, что алкоголизм на сегодняшний день имеет статус мировой социально-медицинской проблемы [1]. Ежегодно в нашей стране на учёт становится 100 тыс. алкоголиков. Однако по оценкам в реальности их больше в десять раз, что приближается к признакам национальной эпидемии. Кроме того, известно, что именно печень является органом, который в первую очередь страдает от воздействия алкоголя, как острого так и хронического. При прохождении алкоголя по желудочно-кишечному тракту он очень быстро всасывается в кровь, но еще до этого, хронически воздействуя на слизистую оболочку, повреждает ее эпителий, а крепкий алкоголь – вызывает химический ожог с последующим рубцеванием. С током крови алкоголь поступает в печень, где нейтрализуется алкогольдегидрогеназой. Под влиянием ряда негативных факторов происходит истощение этих ферментативных систем, некоторые из них просто не успевают восстанавливаться при частом (или постоянном) употреблении алкоголя. При приеме внутрь около 90% алкоголя метаболизируются в печени с образованием ацетальдегида, вещества, поражающего клетки печени – гепатоциты. Поэтому ацетальдегид и алкоголь токсически воздействуют на клетки печени – развивается гепатит, а затем часть клеток гибнет, замещается соединительной тканью – формируется цирроз. Алкоголь и его метаболиты запускают каскад химических реакций в организме, приводящих к гипоксии гепатоцитов и, в конечном итоге, к некрозу клеток печени [2]. В дальнейшем развивается печеночная недостаточность, кроме того, появляется токсическое воздействие алкоголя на другие органы и ткани организма и в первую очередь – центральную нервную систему, эндокринную систему, иммунитет. Учитывая вышесказанное, можно сделать заключение, что подбор адекватного гепатопротектора является в настоящее время первостепенным вопросом.

На основании проведенного первичного фармакологического скрининга было отобрано соединение 2.8, которое представляет собой 4-амино-5-(фуран-2-ил)-4Н-1,2,4-триазол-3-тиол.

Статья является фрагментом НИР «Гиполипидемическая активность новых производных пяти- и шестичленных азагетероциклов и фитопрепаратов при гиперлипидемии и маркетинговые исследования рынка антиатеросклеротических средств» (№ государственной регистрации 0111U005855). Сроки исполнения 2011-2015 гг.



Целью работы было изучение фармакологического действия 4-амино-5-(фуран-2-ил)-4Н-1,2,4-триазол-3-тиола (соединение 2.8) при алкогольном гепатите.

Методы

Для доклинического изучения субстанция данного вещества наработана в лаборатории органического синтеза кафедры токсикологической и неорганической химии Запорожского государственного медицинского университета. Синтез замещенных 1,2,4-триазола проводился под руководством д.фарм.н., проф. А.И. Панасенко и д.фарм.н., проф. Е.Г. Кныша.

Используемая экспериментальная модель гепатита описана в методических разработках под редакцией академика АМН Украины А.В. Стефанова. Гепатит моделировался внутрижелудочным введением 40% раствора этилового спирта в дозе 7 мл/кг 1 раз в сутки в течение 7 суток. Исследуемое вещество и лекарственное средство сравнения тиотриазолин вводили за 1 час до и через 2 часа после введения этанола. Забор крови и тканей печени проводили через 72 часа после последнего введения алкоголя [3].

Опыты проводились на половозрелых 28 белых нелинейных крысах обоих полов массой 120-170 г. Животные, использовавшиеся в эксперименте, были разделены на 4 группы (по 7 крыс): 1-я группа – интактные животные; 2-я группа – контрольные животные; 3-я группа – животные, получавшие этанол + тиотриазолин (в дозе 50 мг/кг); 4-я группа – животные, получавшие этанол + 4-амино-5-(фуран-2-ил)-4Н-1,2,4-триазол-3-тиол (соединение 2.8) (в

дозе 1/10 от ЛД 50 – 146,0 мг/кг). Крысы получены из питомника Института фармакологии и токсикологии АМН Украины (г. Киев). Животные содержались на стандартном пищевом рационе при природном световом режиме «день-ночь». Исследования проводились на основе «Правил доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP)». Забой животных выполняли в соответствии с «Методическими рекомендациями по выведению животных из эксперимента» под эфирным наркозом.

Перед забором материала подопытных животных усыпляли с помощью ингаляционного наркоза с использованием этилового эфира. При аутопсии производили визуальную оценку состояния органов грудной и брюшной полости. Крыс и органы взвешивали в мг и вычисляли относительную массу (%). Забирали небольшую часть правой доли ткани печени крыс, которую помещали сразу жидкость Буэна. Забор органов проводили в течении 5-7 минут с момента смерти. При работе с лабораторными животными пользовались положениями «Европейская Конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 18.03.1986 г.) [3].

В качестве биоматериала использовали сыворотку крови и гомогенат печени. Для приготовления гомогената печени навеску печени растирали на водяной бане в буферном растворе трис-HCl и центрифугировали [4].

Эффективность фармакологического действия оценивали по показателям антицитолитического (аспартатаминотрансфераза (АсАТ), аланинаминотрансфераза (АлАТ), гама-глутамилтранспептидаза (ГГТ) и щелочная фосфотаза (ЩФ)) действия в сыворотке крови (при помощи набора Cormay) [5, 6]. Состояние прооксидантно-антиоксидантного равновесия оценивали по содержанию продуктов ПОЛ и уровня эндогенного α-токоферола (α-ТФ) – компонента антиоксидантной системы (АОС) в ткани печени. Среди промежуточных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) исследовали концентрацию первичных – диеновых, триеновых коньюгатов (ДК, ТК) и конечных продуктов ПОЛ, которые реагируют с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активные продукты) [7].

Полученные данные после биохимического исследования, обрабатывали с помощью программы STATISTICA 6,0 (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5), где достоверность межгрупповых различий по данным экспериментов устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента. Рассчитывали средние арифметические (M) и стандартные погрешности средней (±m). Использовался уровень статистической значимости различий результатов исследований – $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

У крыс второй группы, получавших алкоголь, при вскрытии наблюдался целый ряд изменений со стороны внутренних органов: визуально определялось увеличение и отечность сердца. В брюшной полости у всех исследуемых животных данной группы выявлены атония кишечника и резкое вздутие слепой кишки. Слепая кишка увеличена по сравнению с животными интактной группы в 2-2,5 раза. На слизистой большой кривизны желудка отмечаются единичные эрозии. Селезенка визуально увеличена в размерах. Печень увеличена, отечная. Цвет печени - темный, на ее поверхности у некоторых животных определяются единичные кровоизлияния.

У животных под дейтсвием 4-амино-5-(фуран-2-ил)-4Н-1,2,4-триазол-3-тиола после введения алкоголя с последующим применением исследуемого вещества масса тела в среднем по группе – 153,50±11,520 г. При вскрытии грудной и брюшной полости внутренние органы без особенностей. Сердце не увеличено, явлений отека не обнаружено. Печень визуально не отличается от таковой у интактных животных и крыс группы №3 (тиотриазолин).

У животных после введения исследуемого вещества структура печеночных долек, так же как, и размеры печеночных сосудов, не отличается от таковых у интактных животных. В дольках центролобулярно сохраняется расширение печеночных синусоидов. Выявляются единичные клетки с элементами гидровакуольной дистрофии. Количество лимфоцитов и нейтрофилов незначительно увеличено – 2-5 малых лимфоцита в поле зрения. Явлений отека, очагов некроза не обнаружено. Количество двухядерных гепатоцитов меньше, чем у животных третьей группы.

В контрольной патологии по сравнению с интактными животными отмечалось резкое повышение активности ГГТ (с 2,41±0,20 ммоль/ч·л до 7,26±0,33 ммоль/ч·л), что свидетельствует об острой интоксикации этанолом и является следствием индукции фермента на мембранах микросом печени (табл. 1). Также резко возрастает активность АсАТ и АлАТ. Надо отметить наличие холестаза и атрофических изменений в печени, о чем свидетельствует рост активности ЩФ (с 12,75±0,42 ммоль/ч·л до 29,58±0,42 ммоль/ч·л).

Исследуемое вещество показало выраженное действие по отношению к снижению активности АсАТ и АлАТ (на 51,50% и 62,73% соответственно). Также 4-амино-5-(фуран-2-ил)-4Н-1,2,4-триазол-3-тиол снижал активность ГГТ до нормы (на 62,73%). При этом активность ЩФ снижалась при введении соединения 2.8 на (39,39%). Таким образом, 4-амино-5-(фуран-2-ил)-4Н-1,2,4-триазол-3-тиол не уступал по активности АсАт, АлАт и ГГТ референтному лекарственному средству тиотриазолину.

Для определения степени влияния на процессы ПОЛ при алкогольном гепатите проводились исследования уровня промежуточных продуктов ПОЛ – ДК и ТК , и конечного продукта – ТБК-АП (табл. 2). Так, в контрольной патологии отмечалось существенное повышение ТБК-АП по сравнению с интактными животными (с 51,96±1,88 мкмоль/г до 82,22±4,79 мкмоль/г). Также наблюдалось повышение промежуточных продуктов ПОЛ ДК (с 0,41±0,09 ммоль/г до 4,14±0,31 ммоль/г) и ТК (с 0,042±0,002 ммоль/г до 0,920±0,083 ммоль/г).

Исследуемое соединение 2.8 значительно снижало уровень ТБК-АП (на 44,51%) по сравнению с контрольной патологией. При этом уровень этого показателя был ниже, чем у референтного лекарственного средства – тиотриазолина. В то же время 4-амино-5-(фуран-2-ил)-4Н-1,2,4-триазол-3-тиол не уступал тиотриазолину по эффективности снижать уровень промежуточных продуктов ПОЛ ДК и ТК. Так, исследуемое соединение значительно снижало уровень ДК и ТК (на 62,84% и 48,98% соответственно) по сравнению с контрольной патологией. При этом референтный лекарственное средство тиотриазолин снижал эти показатели ПОЛ (на 62,84% и 48,98% соответственно).

Для исследования антиоксидантной активности определяли неферментативный показатель антиоксидантной системы – α-ТФ. Отметим, что в контрольной патологии отмечалось резкое снижение уровня α-ТФ по сравнению с интактными животными (с 1,81±0,12 ммоль/г до 0,81±0,06 ммоль/г) в ткани печени. При введении 4-амино-5-(фуран-2-ил)-4Н-1,2,4-триазол-3-тиола на фоне алкогольного гепатита выявлен факт сохранения эндогенных запасов α-ТФ, что составляло 131,44% по отношению к контролю и соответствовало уровню у интактных животных. При этом референтное лекарственное средство тиотриазолин лучше сохранял уровень эндогенного α-ТФ (на 190,98% по отношению к контрольной патологии).

Таблица 1 – Показатели антицитолитического действия 4-амино-5-(фуран-2-ил)-4Н-1,2,4-триазол-3-тиола при алкогольном гепатите в сыворотке крови крыс (n=7)

Группа	АсАт, ммоль/ч·л, X±m	АлАт, ммоль/ч·л, X±m	ГГТ, мкмоль/ч·л, X±m	ЩФ, ммоль/ч·л,, X±m
Интактные животные	1,69±0,08*	1,66±0,06*	2,41±0,20*	12,75±0,42*
Контрольная патология	5,64±0,16	7,40±0,47	7,26±0,33	29,58±0,42
Тиотриазолин	3,78±0,26*	4,22±0,36*	3,20±0,21*	17,52±0,96*
Δ %	-32,95%	-42,98%	-55,92%	-40,78%
Соединение 2.8	2,73±0,13*	2,67±0,19*	2,71±0,16*	17,93±0,57*
Δ %	-51,50%	-63,98%	-62,73%	-39,39%

Примечание: * - достоверность p≤0,05 по отношению к контрольной патологии; Δ - изменение по отношению к контролю.

Таблица 2 – Показатели влияния 4-амино-5-(фуран-2-ил)-4Н-1,2,4-триазол-3-тиола на процессы ПОЛ и АОС при алкогольном гепатите в ткани печени крыс

Группа	ТБК-АП, мкмоль/г, X±m	ДК, ммоль/г, X±m	ТК, ммоль/г, X±m	α-ТФ, ммоль/г, X±m
Интактные животные	51,96±1,88*	0,41±0,09*	0,042±0,002*	1,81±0,12*
Контрольная патология	82,22±4,79	4,14±0,31	0,920±0,083	0,81±0,06
Тиотриазолин	53,12±2,48*	1,54±0,19*	0,470±0,141	2,28±0,28*
Δ %	-35,39%	-62,84%	-48,98%	190,98%
Соединение 2.8	45,62±1,64*	1,45±0,13*	0,370±0,114*	1,87±0,08*
Δ %	-44,51%	-64,92%	-59,18%	131,44%

Примечание: * - достоверность p≤0,05 по отношению к контрольной патологии; Δ - изменение по отношению к контролю.

Обобщая полученные данные, можно утверждать, что 4-амино-5-(фуран-2-ил)-4Н-1,2,4-триазол-3-тиол проявляет антицитолитическое действие, которое проявляется снижением маркерных ферментов печени. Также исследуемое вещество уменьшает проявление холестаза, что прослеживается в снижении активности ЩФ. Доказано антиоксидантное действие 4-амино-5-(фуран-2-ил)-4Н-1,2,4-триазол-3-тиола. Так, наблюдалось снижение конечного продукта перекисного окисления липидов ТБК-АП, промежуточных продуктов – ДК и ТК, а также факт сохранения запасов эндогенного α-токоферола.

Учитывая структурную схожесть с тиотриазолином можно предположить, что механизм антиоксидантного действия основан на наличии в структуре молекулы 4-амино-5-(фуран-2-ил)-4Н-1,2,4-триазол-3-тиола третичного атома азота, связывающего избыток ионов водорода и тиола серы, который обладает окислительно-восстановительными свойствами. Представленное соединение может реагировать с активными формами кислорода и липидными радикалами за счет выраженных восстановительных свойств тиольной группы и предупреждает инициирование активных форм кислорода путем реактивации антирадикальных ферментов – супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы.

Заключение

Применение 4-амино-5-(фуран-2-ил)-4Н-1,2,4-триазол-3-тиола показало улучшение морфологического состояния внутренних органов животных после введения тертрахлорметана. Так, после введения исследуемого вещества по внешнему виду внутренние органы не отличались от внутренних органов интактных животных.

4-амино-5-(фуран-2-ил)-4Н-1,2,4-триазол-3-тиол показал лучшие показатели гепатопротекторной активности и антиоксидантного действия по сравнению с референтным лекарственным средством тиотриазолином. Так, отмечалось существенное снижение активности АсАТ, АлАТ и ГГТ в сыворотке крови. Также исследованное соединение выражено снижало уровень конечного продукта – ТБК-АП и промежуточных продуктов ПОЛ – ДК и ТК.

Проведенные исследования показали перспективность 4-амино-5-(фуран-2-ил)-4Н-1,2,4-триазол-3-тиола как потенциального гепатопротекторного средства. Дальнейшая работа направлена на исследование свойств данного вещества при других патологиях со стороны гепатобиллиарной системы.

Литература

1. WHO. European status report on alcohol and health. – Copenhagen, 2010. – 178 p.
2. Байкова, И. Е. Алкогольная болезнь печени / И. Е. Байкова, И. Г. Никитин, Л. М. Гогова // Российский медицинский журнал. – 2011. – Т. 19, № 17. – С. 1067-1071.
3. Доклінічні дослідження лікарських засобів : методичні рекомендації / за ред. член-кор. АМН України О. В. Стефанова. – К. : Авіцена, 2001. – 528 с.
4. Биоэнергетика клетки. Химия патологических

процессов : учеб. пособие / под ред. В. Ю. Сереброва, Г. А. Сухановой. – Томск : Сибирский государственный медицинский университет, 2008. – 180 с.
5. Cirrhosis and mortality risks of biopsy-verified alcoholic pure steatosis and steatohepatitis: a nationwide registry-based study / T. Deleuran [et al.] // Alimentary Pharmacology and Therapeutics. – 2012 Jun. – Vol. 35, N 11. – P. 1336-1342.
6. Патогенетическое обоснование применения эффективных гепатопротективных средств при экспериментальной токсической гепатопатии/ А. В. Рыжкина [и др.] // Здоровье и образование в XXI веке : материалы VII Междунар. науч.-практ. конф., 23-26 нояб. 2006 г. – Москва : Изд-во РУДН, 2006. – С. 426.
7. Ткач, С. М. Эффективность и безопасность гепатопротекторов с точки зрения доказательной медицины / С. М. Ткач // Здоровье Украины. – 2009. – № 6. – С. 7–10.

Поступила 26.05.2014 г.
Принята в печать 09.06.2014 г.

Сведения об авторах:
Белай И.М. – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической фармации, фармакотерапии и УЭФ ФПО «Запорожский государственный медицинский университет», Украина;
Михайлюк Е.О. – асистент кафедры клинической фармации, фармакотерапии и УЭФ ФПО «Запорожский государственный медицинский университет», Украина;
Парченко В.В. – д.ф.н., доцент кафедры токсикологической и неорганической химии УЭФ ФПО «Запорожский государственный медицинский университет», Украина;
Панасенко А.И. – д.ф.н., профессор, заведующий кафедрой токсикологической и неорганической химии УЭФ ФПО «Запорожский государственный медицинский университет», Украина;
Кныш Е.Г. – д.ф.н., профессор, заведующий кафедрой управления и экономики фармации, медицинского и фармацевтического товароведения УЭФ ФПО «Запорожский государственный медицинский университет», Украина.

Адрес для корреспонденции: 69121, Украина, г. Запорожье, ул. Товарищеская, д. 41, кв. 37. Тел.: 096-795-98-28, e-mail: eomihayluk@mail.ru – Михайлюк Евгений Олегович.