

К. О. Калько<sup>1</sup>, С. М. Дроговоз<sup>1</sup>, А. В. Кононенко<sup>1</sup>, Н. В. Захарко<sup>2</sup>,  
Т. В. Горбач<sup>3</sup>, О. Я. Міщенко<sup>1</sup>, Н. В. Бездітко<sup>1</sup>

## Циркадіанні біоритми вуглеводного обміну в щурів за умов гострого парацетамолового гепатиту

<sup>1</sup>Національний фармацевтичний університет, м. Харків

<sup>2</sup>Рівненський державний базовий медичний коледж

<sup>3</sup>Харківський національний медичний університет

**Ключові слова:** печінка, парацетамол,  
вуглеводний обмін, циркадіанний ритм

Циркадіанна залежність виразності фармакологічного та побічного ефектів препаратів неодноразово підтверджувалася результатами хронофармакологічних доклінічних та клінічних досліджень [1]. А врахування хроноефективності та хронотоксичності лікарських засобів у клінічній практиці удосконалює терапію будь-якого захворювання [2]. З метою такого хронодетермінованого прийому препаратів слід враховувати особливості «хронопортрета» кожного лікарського засобу. На жаль, натеper дані такого характеру обмежені та існують тільки для окремих препаратів.

Гепатопротектори – лікарські засоби, що часто призначаються для лікування захворювань гепатобіліарної системи, циркадіанна залежність гепатопротекторної активності яких не встановлена. Модель гострого парацетамолового гепатиту використовують при доклінічному дослідженні гепатопротекторів. Сьогодні відома циркадіанна залежність токсичності парацетамолу, яку оцінювали за ступенем зміни активності маркерів цитолізу на тлі гострого парацетамолового гепатиту [3]. Однак циркадіанні особливості порушень біоритмів вуглеводного обміну, як важливого показника функціонального стану печінки, на тлі цієї моделі патології невідомі, тоді як властивість гепатопротектора підтримувати (регулювати) вуглеводний баланс, важлива складова прояву гепатопротекторної дії препарату [4].

*Мета дослідження* – встановлення циркадіанних ритмів вуглеводного обміну за фізіологічних умов та їхній десинхроноз за умов гострого парацетамолового гепатиту в щурів.

**Матеріали та методи.** Дослідження проводили на щурах обох статей на моделі гострого парацетамолового гепатиту (березень 2015 року). Тварин утримували в розпліднику ЦНДЛ НФаУ м. Харкова за стандартного температурного режиму, вологості повітря та світлового режиму, що відповідав природним умовам (тривалість світлового дня 12–13 год). Контрольну патологію моделювали одноразовим введенням парацетамолу в дозі 1000 мг/кг у вигляді суспензії на 2 % розчині крохмального гелю в такі години доби: 03.00; 09.00; 15.00; 21.00 [5]. Евтаназію тварин, забір крові та печінки проводили через 24 год після введення парацетамолу. З цільної крові отримували сироватку за загальноприйнятими методиками, в якій визначали вміст глюкози та кортикостерону; з тканини печінки отримували гомогенати для визначення вмісту глікогену. Уміст глюкози визначали глюкозооксидазним методом за допомогою набору виробництва НВП «Філісит-Діагностика» (Україна); уміст глікогену – антроновим методом, кортикостерону – за допомогою набору Corticosterone EIA Kit – Enabling Discovery in Life Sciences (Японія) методом імуоферментного аналізу [6]. Глюкоза та глікоген є маркерами вуглеводного обміну, у регуляції рівня яких суттєву роль відіграє кортикостерон. Вибір обох статей щурів для експерименту зумовлений прагненням

встановити особливості змін циркадіанних ритмів вуглеводного обміну з урахуванням статевієї приналежності тварин.

В експерименті було використано 128 щурів, а в кожній часовій групі було по 8 самиць та 8 самців масою 170–220 г. Проведення дослідів у вечірній та нічний періоди під інфрачервоною лампою дозволило нівелювати вплив світлового фактора на синтез мелатоніну [7]. Дані підлягали статистичному опрацюванню за допомогою програми Cosinor-Analysis 2.4 for Excel 2000/XP та пакета статистичних програм «Statistica 8,0». Використовували непараметричний критерій Манна-Вітні. При порівнянні статистичних показників був прийнятий рівень значущості  $p < 0,05$  [5, 8].

Під час аналізу отриманих даних визначали акрофазу (момент доби, коли реєструється максимальне значення досліджуваного показника) та батифазу (момент доби, коли значення досліджуваного показника мінімальне), мезор (середнє значення досліджуваного показника протягом доби) та амплітуду (найбільше відхилення від мезора в обидві сторони) показників біоритмів вуглеводного обміну [1]. Останні два показника вираховували за допомогою програми Cosinor-Analysis 2.4 for Excel 2000/XP [9].

Усі маніпуляції та евтаназію тварин проводили відповідно до біоетичних норм поводження з лабораторними тваринами (Страсбург, 1986 р.) та рекомендацій Національного конгресу з біоетики (Київ, 2001 р.) [9]. Протокол дослідження схвалено локальним етичним комітетом (протокол від 18 березня 2015 р. № 3).

**Результати та їх обговорення.** За умов розвитку гострого парацетамолового гепатиту вміст глюкози в сироватці крові тварин обох статей не зазнавав достовірно значущих змін порівняно з інтактними тваринами, що підтверджується несуттєвими змінами величини мезора з  $(7,69 \pm 0,23)$  до  $(7,44 \pm 0,26)$  мкмоль/л у самиць та з  $(5,97 \pm 0,14)$  до  $(6,77 \pm 0,11)$  мкмоль/л у самців і амплітуди ритму з  $(0,91 \pm 0,36)$  до  $(0,80 \pm 0,21)$  мкмоль/л у самиць та з

$(1,57 \pm 0,30)$  до  $(1,09 \pm 0,39)$  мкмоль/л у самців (табл. 1, 2). Проте спостерігали десинхроноз циркадіанного ритму вмісту глюкози, який характеризувався зміщенням періоду акрофази ритму у тварин обох статей з 03.00 на 21.00, тоді як батифазу спостерігали о 09.00 у самиць та самців, як і в інтактних тварин (табл. 1).

Одночасно відбувалося зменшення вмісту глікогену в умовах парацетамолового гепатиту в усіх циркадіанних групах самиць та самців. Зокрема, моделювання патології о 03.00 характеризувалося достовірним зменшенням вмісту глікогену на 39 % у самиць та на 53 % у самців порівняно з інтактними тваринами, тоді як у часовій групі 09.00 уміст глікогену в аналогічних умовах достовірно знижувався на 44 та 48 % відповідно. Найменш виразне зменшення вмісту даного показника спостерігалося о 15.00 – на 6 % у самиць та на 15 % у самців, тоді як о 21.00 – на 33 % та 20 % відповідно (табл. 1). Суттєве зменшення вмісту глікогену в печінці щурів з патологією підтверджується достовірним зниженням мезора ритму даного показника на 31 % у самиць та на 35 % у самців, тоді як амплітуда ритму зменшувалася в 2 рази в самиць та була практично незмінною в самців (табл. 2). Акрофаза вмісту глікогену в самиць та самців зміщувалася з 03.00 на 15.00 зі збереженням батифази (09.00), характерної для інтактних тварин обох статей (табл. 1).

Уміст кортикостерону, як і глюкози, не мав достовірно значущих відмінностей у тварин з гепатитом та інтактних, що підтверджується несуттєвими змінами величини мезора з  $(89,85 \pm 2,07)$  до  $(83,83 \pm 1,60)$  пкг/мл у самиць та з  $(97,94 \pm 2,46)$  до  $(104,68 \pm 2,37)$  пкг/мл у самців і амплітуди ритму з  $(49,64 \pm 3,62)$  до  $(39,17 \pm 1,17)$  пкг/мл у самиць та з  $(51,09 \pm 2,31)$  до  $(48,49 \pm 5,85)$  пкг/мл у самців. Періоди акрофази (03.00 – самиці та самці) та батифази (15.00 – самиці; 09.00 – самці) ритму вмісту кортикостерону тварин з гепатитом синфазні таким у інтактних щурів (табл. 1, 2).

Таким чином, результати досліджень свідчать про циркадіанну селективність

**Циркадіанні ритми вуглеводного обміну  
за умов гострого парацетамолового гепатиту (n = 8)**

Показник	Група тварин	03.00	09.00	15.00	21.00
<b>Самиці</b>					
Глюкоза, мкмоль/л	Інтактний контроль	8,49 ± 0,50	7,04 ± 0,59	7,06 ± 0,49	8,16 ± 0,79
	Гепатит	7,04 ± 0,49	6,79 ± 0,19	7,65 ± 0,37	8,27 ± 0,51
Глікоген, мг/г	Інтактний контроль	3,04 ± 0,20 <sup>#</sup>	1,85 ± 0,18	2,25 ± 0,21	1,96 ± 0,19
	Гепатит	1,85 ± 0,18 <sup>*/&amp;</sup>	1,03 ± 0,10 <sup>*</sup>	2,12 ± 0,16 <sup>&amp;</sup>	1,32 ± 0,19 <sup>*</sup>
Зміна показника відносно контролю		↓39 %	↓44 %	↓6 %	↓33 %
Кортикостерон, пкг/мл	Інтактний контроль	139,97 ± 6,35 <sup>#</sup>	60,52 ± 1,03 <sup>#</sup>	52,12 ± 0,81	106,80 ± 4,90 <sup>#</sup>
	Гепатит	121,48 ± 1,58 <sup>&amp;</sup>	67,12 ± 11,23 <sup>&amp;</sup>	50,35 ± 1,12 <sup>&amp;</sup>	98,17 ± 2,00 <sup>&amp;</sup>
<b>Самці</b>					
Глюкоза, мкмоль/л	Інтактний контроль	7,07 ± 0,43 <sup>#</sup>	4,34 ± 0,18	5,46 ± 0,35 <sup>#</sup>	7,01 ± 0,70
	Гепатит	6,42 ± 0,60	5,64 ± 0,34	7,46 ± 0,49 <sup>&amp;</sup>	7,56 ± 0,24 <sup>&amp;</sup>
Глікоген, мг/г	Інтактний контроль	3,02 ± 0,10 <sup>#</sup>	1,92 ± 0,15	2,40 ± 0,11 <sup>#</sup>	1,76 ± 0,06
	Гепатит	1,43 ± 0,16 <sup>*</sup>	0,99 ± 0,10 <sup>*</sup>	2,04 ± 0,06 <sup>*/&amp;</sup>	1,41 ± 0,19
Зміна показника відносно контролю		↓53 %	↓48 %	↓15 %	↓20 %
Кортикостерон, пкг/мл	Інтактний контроль	146,12 ± 4,67 <sup>#</sup>	57,17 ± 2,32	66,84 ± 6,80	121,65 ± 4,63 <sup>#</sup>
	Гепатит	131,94 ± 4,90 <sup>&amp;</sup>	65,33 ± 12,22	74,68 ± 9,40	124,85 ± 5,10 <sup>&amp;</sup>

Примітка. Тут і в табл. 2: <sup>\*</sup>Відхилення показника достовірно значуще відрізняється від показника інтактних тварин ( $p < 0,05$ ), <sup>#</sup>відхилення показника достовірно значуще відрізняється від мінімального показника в групі інтактних тварин ( $p < 0,05$ ), <sup>&</sup>відхилення показника достовірно значуще відрізняється від мінімального показника в групі тварин з гепатитом ( $p < 0,05$ ), n – кількість тварин у групі.

прояву гепатотоксичних властивостей парацетамолу щодо вуглеводного обміну, зокрема, у нічний та ранковий період введення парацетамолу спричинює найвиразніше зниження вмісту глікогену в гепатоцитах, тоді як при денному введенні зменшення вмісту глікогену під впливом парацетамолу характеризується мінімальними змінами, а при вечірньому – проміжним зниженням протягом доби. Вищенаведена циркадіанно детермінована властивість парацетамолу знижувати вміст глікогену в гепатоцитах за гострого парацетамолового гепатиту може бути пов'язаною з добовою залежністю токсичної дії ксенобіо-

тика на стан прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу. Відомо, що парацетамол у терапевтичних дозах метаболізується за участю системи глутатіону, але у випадку передозування (що й спостерігалось при моделюванні гострого гепатиту) концентрація токсичних метаболітів парацетамолу перевищує компенсаторні можливості організму. Токсичні метаболіти, що утворюються в результаті біотрансформації парацетамолу системою цитохрому P450 (зокрема, N-ацетилбензохінонімін), здатні до взаємодії з цитолемою та клітинними мембранами органел гепатоцитів, внаслідок чого активуються процеси ВРО

*Хронобіологічна характеристика вуглеводного обміну в інтактних тварин та за умов гострого парацетамолового гепатиту (циркадіанний ритм)*

Показник	Інтактний контроль		Гепатит	
	Мезор	Амплітуда	Мезор	Амплітуда
<b>Самиці</b>				
Глюкоза, мкмоль/л	7,69 ± 0,23	0,91 ± 0,36	7,44 ± 0,26	0,80 ± 0,21
Глікоген, мг/г	2,27 ± 0,09	0,40 ± 0,13	1,58 ± 0,03*	0,20 ± 0,09*
Кортикостерон, пкг/мл	89,85 ± 2,07	49,64 ± 3,62	83,83 ± 1,60	39,17 ± 1,17
<b>Самці</b>				
Глюкоза, мкмоль/л	5,97 ± 0,14	1,57 ± 0,30	6,77 ± 0,11	1,09 ± 0,39
Глікоген, мг/г	2,27 ± 0,07	0,32 ± 0,05	1,47 ± 0,07*	0,37 ± 0,11
Кортикостерон, пкг/мл	97,94 ± 2,46	51,09 ± 2,31	104,68 ± 2,37	48,49 ± 5,85

фосфоліпідів біологічних мембран, що призводить до інактивації і солюбілізації зв'язаних з мембраною ферментів, розладу процесів тканинного дихання, пластичного обміну, окиснювального фосфорилування та енергопродукції клітини, що й призводить до зниження вмісту глікогену [11]. Оскільки виразність десинхронотичної дії парацетамолу на систему ПОЛ-АОЗ не однакова залежно від часу моделювання патології, то й відповідно по різному протягом доби буде проявлятися десинхроноз діяльності гепатоцитів і зменшення вмісту глікогену в них. Щодо зміни рівня глюкози на тлі парацетамолового гепатиту, то десинхроноз ритму даного показника характеризувався зміщенням періодів акрофази та батифази, тоді як для рівня кортикостерону зберігалася архітектоніка циркадіанного ритму, характерна для інтактних тварин.

### Висновки

1. За умов гострого парацетамолового гепатиту порушується циркадіанний ритм вмісту глюкози в сироватці крові, а саме: зміщується період акрофази з 03.00 на 21.00 у самиць та самців порівняно з інтактними тваринами, тоді як величина мезора ритму вмісту глюкози та амплітуда ритму змінюються несуттєво.

2. Зниження вмісту глікогену в печінці за умов патології підтверджується достовірним зменшенням мезора ритму даного показника на 31 % у самиць та на 35 % у самців порівняно з інтактними тваринами. Найвиразніше зменшення вмісту глікогену спостерігали о 09.00 у самиць (на 44 %) та о 03.00 у самців (на 53 %), а мінімальні зміни даного показника в щурів обох статей реєстрували о 15.00 (на 6 % у самиць та на 15 % у самців).
3. Моделювання гострого парацетамолового гепатиту не супроводжувалося змінами циркадіанного ритму вмісту кортикостерону, про що свідчить збереження архітектоніки ритму, характерної для інтактних щурів.
4. Аналіз отриманих результатів щодо токсичного впливу парацетамолу на циркадіанні ритми показників вуглеводного обміну свідчить про відсутність суттєвих статевих відмінностей у порушенні біоритмів під впливом даного ксенобіотика.
5. Встановлені хроноособливості змін вуглеводного обміну за умов гострого парацетамолового гепатиту слід враховувати при аналізі результатів хронофармакологічних доклінічних досліджень гепатопротекторів.

1. Хронофармакологія наглядно (Хронофармакологія в таблицях и рисунках): Справочник – учебное пособие / С. М. Дроговоз [и др.]. – Харьков : Титул, 2014. – 128 с.
2. Cugini P. Chronobiology: Principles and Methods / P. Cugini // Annali Istituto Superiore di Sanità – 1993. – V. 29. – P. 483–500.

3. Дроговоз С. М. Оптимізація режиму прийому пара-ацетамінофенолу з врахуванням біоритмів печінки: інфор. Лист Укрмедпатентінформу МОЗ України № 276-2015 / С. М. Дроговоз, К. О. Калько, Н. В. Захарко. – Київ, 2015. – 4 с.
4. Матвеев А. В. Гепатопротекторы. Анализ международных исследований по препаратам группы лекарств для печени / А. В. Матвеев. – Симферополь : ИТ «Ариал», 2013. – 384 с.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств ; Под. ред. докт. мед. наук. А. Н. Миронова. – Москва : Гриф и К, 2012. – Ч. 1. – 944 с.
6. Мешкова Н. П. Практикум по биохимии. Определение гликогена с антроном / Н. П. Мешкова, С. Е. Северин. – Москва : Издательство Московского университета, 1979. – С. 41–43.
7. Семененко С. Б. Особливості структури хроноритмів екскреторної функції нирок за умов гіперфункції шишкоподібної залози / С. Б. Семененко // Буковинський медичний вісник. – 2014. – Т. 18, № 2 (70). – С. 99–101.
8. Карп В. П. Вычислительные методы анализа в хронобиологии и хрономедицине / В. П. Карп, Г. С. Катинас. – С. : СПб, 1997. – 115 с.
9. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – 3-е изд. / О. Ю. Реброва. – Москва : МедиаСфера, 2006. – 312 с.
10. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / За ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. – Київ : ВД «Авіцена», 2001. – 528 с.
11. Вплив токсичних доз парацетамолу на циркадіанний ритм прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу / К. О. Калько, С. М. Дроговоз, Н. В. Захарко, Т. К. Юдкевич // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2016. – № 1 (47) – С. 81–86.

**К. О. Калько, С. М. Дроговоз, А. В. Кононенко, Н. В. Захарко,  
Т. В. Горбач, О. Я. Мищенко, Н. В. Бездітко**

### **Циркадіанні біоритми вуглеводного обміну в щурів за умов гострого парацетамолового гепатиту**

*Мета дослідження* – встановлення циркадіанних ритмів вуглеводного обміну за фізіологічних умов та їхній десинхроноз за умов гострого парацетамолового гепатиту в щурів.

Дослідження проводили на щурах обох статей на моделі гострого парацетамолового гепатиту, який моделювали в наступні періоди доби: ранковий (09.00), денний (15.00), вечірній (21.00) та нічний (03.00) одноразовим введенням парацетамолу в дозі 1000 мг/кг. Дослідження проводили через 24 год після введення ксенобіотика. Циркадіанні ритми вуглеводного обміну оцінювали за вмістом глюкози, глікогену та кортикостерону.

Встановлено, що десинхроноз циркадіанних ритмів вуглеводного обміну за умов гострого парацетамолового гепатиту характеризується зміщенням періоду акрофази циркадіанного ритму вмісту глюкози в тварин обох статей з 03.00 на 21.00, тоді як порушення циркадіанного ритму вмісту глікогену відзначається достовірним зменшенням мезора ритму даного показника на 31 % у самиць та на 35 % у самців відносно інтактних тварин. Найвиразніше зменшення вмісту глікогену спостерігали о 09.00 у самиць (на 44 %) та о 03.00 у самців (на 53 %), а мінімальні зміни даного показника в щурів обох статей реєстрували о 15.00 (на 6 % у самиць та на 15 % у самців). За умов парацетамолового гепатиту циркадіанний ритм вмісту кортикостерону не зазнавав змін та характеризувався аналогічною інтактним тваринам архітектонікою. Отриманні результати слід враховувати з метою адекватної оцінки результатів експериментів при вивченні традиційних і перспективних гепатопротекторів.

*Ключові слова:* печінка, парацетамол, вуглеводний обмін, циркадіанний ритм

**Е. А. Калько, С. М. Дроговоз, А. В. Кононенко, Н. В. Захарко,  
Т. В. Горбач, О. Я. Мищенко, Н. В. Бездетко**

### **Циркадіанні біоритми вуглеводного обміну у крыс в умовах гострого парацетамолового гепатиту**

*Цель исследования* – установление циркадианных ритмов углеводного обмена в физиологических условиях и их десинхроноз при остром парацетамоловом гепатите.

Исследования проводили на крысах обоего пола на модели острого парацетамолового гепатита, который моделировали однократным введением парацетамола в дозе 1000 мг/кг в следующие периоды суток: утренний (09.00), дневной (15.00), вечерний (21.00) и ночной (03.00). Исследование проводили через 24 ч после введения ксенобиотика. Циркадианные ритмы углеводного обмена оценивали по содержанию глюкозы, гликогена и кортикостерона.

Установлено, что десинхроноз циркадианных ритмов углеводного обмена в условиях острого парацетамолового гепатита характеризуется смещением периода акрофаза циркадианного ритма содержания глюкозы у животных обоего пола с 03.00 на 21.00, тогда как нарушение циркадианного ритма содержания гликогена проявляется достоверным уменьшением мезора ритма данного показателя на 31 % у самок и на 35 % у самцов относительно интактных животных. Наиболее выраженное уменьшение содержания гликогена наблюдали в 09.00 у самок (на 44 %) и в 03.00 у самцов (на

---

53 %), а минимальное изменение данного показателя у крыс двух полов регистрировали в 15.00 (на 6 % у самок и на 15 % у самцов). В условиях парацетамолового гепатита циркадианный ритм содержания кортикостерона не изменялся и характеризовался аналогичной интактным животным архитектоникой. Полученные данные следует учитывать с целью адекватной оценки результатов экспериментов при изучении традиционных и перспективных гепатопротекторов.

*Ключевые слова:* печень, парацетамол, углеводный обмен, циркадианный ритм

**E. A. Kalko, S. M. Drogovoz, A. V. Kononenko, N. V. Zacharko,  
T. V. Gorbach, O. Ya. Mischenko, N. V. Bezdetko**

**Circadian biorhythms of carbohydrate metabolism in rats under acute paracetamol hepatitis**

*The aim of the study* was to establish the circadian rhythms of carbohydrate metabolism under physiological conditions and their desynchronization under acute hepatitis caused by paracetamol.

Investigations were carried out on rats of the two sexes in the model of acute hepatitis that was modeled by paracetamol in the following periods of the day: morning (09.00), day (15.00), evening (21.00) and night (03.00) by a single administration of paracetamol at a dose of 1000 mg/kg of body weight. The animals were decapitated in 24 h after administration of the xenobiotic. Circadian rhythms of carbohydrate metabolism was evaluated by glucose, glycogen and corticosterone levels.

It was found that desynchronization of circadian rhythms of carbohydrate metabolism in acute hepatitis caused by paracetamol is characterized by a shift period of acrophase of circadian rhythm of glucose in animals of both sexes from 03.00 to 21.00, while the violation of the circadian rhythm of glycogen manifested by significant reduction of mezo rate of this index by 31 % in females and 35 % in males as to intact animals. The most pronounced decrease in glycogen content occurs at 09.00 in females (44 %) and 03.00 in males (53 %) and minimal changes in this index in rats of both sexes were recorded at 15.00 (6 % in females and 15 % males). In terms of paracetamol hepatitis circadian rhythm of corticosterone content did not change and was characterized by a similar to intact animals architectonic. The data obtained should be taken into account for the purpose of adequate evaluation of the experimental results in studying both traditional and perspective hepatoprotectors.

*Key words:* liver, paracetamol, carbohydrate metabolism, circadian rhythm

---

*Надійшла: 23 лютого 2016 р.*

**Контактна особа:** Калько Катерина Олександрівна, аспірант, кафедра фармакології та лікарської токсикології, Національний фармацевтичний університет, м. Харків.  
Електронна пошта: kalko\_sonkina@mail.ru