

К. О. Калько¹, С. М. Дроговоз¹, Н. В. Захарко², Т. К. Юджевич³

Вплив токсичних доз парацетамолу на циркадіанний ритм прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу

¹Національний фармацевтичний університет, м. Харків²Рівненський державний базовий медичний коледж³Центральна науково-дослідна лабораторія Національного фармацевтичного університету, м. Харків

Ключові слова: печінка, гострий гепатит, парацетамол, циркадіанний ритм, прооксидантно-антиоксидантна система

Розробка хронодетермінованих схем прийому препаратів – перспективний напрям оптимізації терапії. Основою даного терапевтичного підходу є врахування циркадіанної ритму показників функціонального стану організму та їхній десинхроноз за умов патології [1]. Практично при всіх патологічних процесах організму реєструється десинхроноз (порушення) зі сторони прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу [2, 3]. Однак даних відносно десинхронозу системи ПОЛ-АОЗ на моделі парацетамолового ушкодження печінки немає, тоді як саме дана модель парацетамолового гепатиту подібна за механізмом пошкодження печінки лікарськими засобами, що призначаються тривалими терапевтичними курсами (антибіотиками, протигрибковими, протиепілептичними та ін.) [4]. Отже, встановлення особливостей десинхронозу циркадіанного ритму системи ПОЛ-АОЗ при патології є актуальним питанням, а отримані дані можна використовувати при хронодетермінованому призначенні лікарських препаратів, зокрема, гепатопротекторів.

Мета дослідження – встановлення циркадіанного ритму системи ПОЛ – АОЗ у фізіологічних умовах та її десинхроноз за умов парацетамолового ушкодження печінки.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на щурах обох статей на моделі парацетамолового гепатиту (березень 2015 року). Модель гострого

ушкодження печінки викликали одноразовим введенням даного ксенобіотику в дозі 1000 мг/кг у вигляді суспензії на 2 % розчині крохмального гелю в наступні години доби: 03.00; 09.00; 15.00; 21.00 [5]. Евтаназію тварин і забір крові та печінки проводили через 24 год після введення парацетамолу. У гомогенаті печінки визначали вміст відновленого глутатіону (ВГ), ТБК-активних продуктів (ТБК-АП), активність супероксиддисмутази (СОД) та каталази [6]. Вибір обох статей тварин для експерименту зумовлений прагненням встановити добову залежність десинхронізуючого впливу токсичних доз парацетамолу з урахуванням статевієї приналежності тварин.

У експерименті було використано 128 щурів, а в кожній групі було по 8 самиць та 8 самців масою 170–220 г. З метою нівелювання впливу світлового фактора на синтез мелатоніну у вечірній та нічний періоди досліди проводили під інфрачервоною лампою [7]. Дані статистично опрацьовані за допомогою програми Cosinor-Analysis 2.4 for Excel 2000/XP та пакета статистичних програм «Statistica 8,0». Використовували непараметричний критерій Манна-Уїтні. При порівнянні статистичних показників був прийнятий рівень значущості $p < 0,05$ [8].

Під час аналізу отриманих даних визначали **акрофазу** (момент доби, коли реєструється максимальне значення досліджуваного показника) та **бати-фазу** (момент доби, коли значення досліджуваного показника мінімальне), мезор (середнє значення досліджуваного показника протягом доби) та амплітуду (найбільше відхилення від мезора

в обидва боки) показників системи АОЗ та активності процесів ПОЛ [8, 9]. Останні два показника вираховували за допомогою програми Cosinor-Analysis 2.4 for Excel 2000/XP [9].

Результати та їх обговорення. Парацетамол (пара-ацетамінофен) – ненаркотичний анальгетик з центральним механізмом дії, у процесі біотрансформації утворює полярний високотоксичний метаболіт N-ацетил-p-бензохінонімін, який активує процеси ПОЛ у гепатоцитах [10].

Встановлено, що введення токсичних доз парацетамолу щурам призводить до розвитку десинхронозу системи АОЗ, що підтверджується зміною циркадіанної ритміки ключових компонентів АОС. Оскільки в метаболізмі парацетамолу бере участь система глутатіону [2], у групах патології спостерігали зниження вмісту саме ВГ у гепатоцитах у тварин обох статей. У самиць незалежно від годин дослідження, у які моделювали патологію (03.00; 09.00; 15.00; 21.00), рівень ВГ знижувався практично однаково – на 18–20 %, тоді як у самців показник знижувався по різному (табл. 1). Зокрема, розвиток парацетамолового гепатиту о 15.00 характеризується зниженням рівня ВГ на 20 % у тварин з патологією відносно інтактних, тоді як о 09.00 і 21.00 однаково – на 40 % та на 48 % о 03.00. У всіх вищенаведених випадках уміст ВГ у самиць та самців з патологією відносно інтактних тварин мав виразну тенденцію до зниження, але показник був статистично недостовірним (табл. 1).

За умов парацетамолового ушкодження печінки величина мезору вмісту ВГ зменшувалася на 21 % у самиць та на 36 % у самців відносно здорових тварин, що вказує на зниження рівня ключового компонента системи АОЗ за умов патологічного процесу. У щурів обох статей з патологією незмінним залишався період акрофази (15.00) та батифази (03.00), циркадіанного вмісту ВГ, який характерний здоровим тваринам. Також, незмінною залишалася амплітуда ритму ВГ у самців, тоді як у самиць вона знижувалася на 25 % відносно інтактних щурів, що свідчить про збереження у самців архітектоники

ритму, характерного інтактним тваринам, та про «згладження» ритму у самиць за умов патології (табл. 2).

Таким чином, згідно з вищенаведеними результатами, одноразове введення токсичної дози парацетамолу призводить до зниження вмісту ВГ, а виразність даних змін характеризується циркадіанною залежністю та статтю досліджуваних тварин.

На тлі введення парацетамолу самицям та самцям циркадіанна активність СОД не зазнає суттєвих змін, зокрема, у самиць мезор знижується з $(44,20 \pm 1,08)$ до $(40,24 \pm 2,26)$ у. о., а у самців – з $(44,97 \pm 2,32)$ до $(41,01 \pm 1,71)$ у. о.; амплітуда ритму незмінна в самиць та зменшується в 3,4 разу в самців («згладження» – вирівнювання циркадіанного ритму активності СОД у самців) (табл. 2).

На відміну від циркадіанної активності СОД на тлі патології, ритм активності каталази зазнавав змін протягом 1 доби. Зокрема, нівелюється циркадіанний пік активності (акрофаза) даного ферменту, який у інтактних тварин обох статей спостерігається о 15.00. Введення парацетамолу призводить до достовірного зниження активності каталази в цей період в 1,6 разу в самиць та в 1,8 разу в самців відносно інтактних тварин (табл. 1). Мезор даного показника зменшується на 15 % у самиць та на 18 % у самців, тоді як суттєво зменшується амплітуда ритму: у самиць на 97 % та на 76 % у самців, що свідчить про нівелювання циркадіанного ритму даного показника. Отже, аналіз величини мезору та амплітуди циркадіанного ритму активності каталази у тварин з патологією підтверджує розвиток десинхронозу на тлі парацетамолового ушкодження з порушенням циркадіанної архітектоники норморитму діяльності печінки, що характерна інтактним тваринам.

За фізіологічних умов у гепатоцитах присутній певний рівень ТБК-АП, уміст яких зазнає добових коливань залежно від стану системи ПОЛ-АОЗ (табл. 1). Рівень ТБК-АП, встановлений у наших експериментах як маркер активності процесів ПОЛ на тлі введення парацетамолу, практично не змінюється

Зміни циркадіанного ритму системи ПОЛ-АОЗ у щурів під впливом токсичної дози парацетамолу (n = 6-7)

Показник	Група тварин	Години доби, коли вводили токсичну дозу парацетамолу			
		03.00	09.00	15.00	21.00
Самиці					
Відновлений глутатіон, у. о.	Інтактний контроль	87,52 ± 8,25	105,21 ± 11,65	154,25 ± 13,52	78,33 ± 14,54
	Парацетамол, 1 г/кг	70,02 ± 19,78	75,49 ± 12,45	123,84 ± 8,57	68,45 ± 16,93
Зміна показника відносно інтактного контролю, %		↓20	↓18	↓20	↓18
Супероксид-дисмутаза, у. о.	Інтактний контроль	42,59 ± 3,18	48,83 ± 2,59	46,04 ± 3,63	39,36 ± 3,73
	Парацетамол, 1 г/кг	39,16 ± 3,94	43,48 ± 2,56	43,00 ± 2,84	35,34 ± 2,88
Каталаза, мккат/л	Інтактний контроль	43,60 ± 2,89	50,46 ± 4,24	78,22 ± 3,74	50,08 ± 3,07
	Парацетамол, 1 г/кг	48,15 ± 6,76	46,27 ± 5,56	48,98 ± 8,19*	46,58 ± 5,25
Зміна показника відносно інтактного контролю, %		–	–	↓37	–
ТБК-активні продукти, мкмоль/г	Інтактний контроль	25,85 ± 2,85	16,24 ± 2,36	17,21 ± 3,37	30,51 ± 0,81
	Парацетамол, 1 г/кг	29,06 ± 4,88	16,23 ± 3,60	19,02 ± 2,03	33,12 ± 3,61
Самці					
Відновлений глутатіон, у. о.	Інтактний контроль	70,74 ± 17,93	105,65 ± 10,96	157,75 ± 13,58	89,71 ± 17,47
	Парацетамол, 1 г/кг	36,54 ± 12,99	62,98 ± 3,44	125,81 ± 14,82	47,68 ± 13,27
Зміна показника відносно інтактного контролю, %		↓48 %	↓40 %	↓20 %	↓40 %
Супероксид-дисмутаза, у. о.	Інтактний контроль	47,09 ± 3,65	48,35 ± 4,26	44,28 ± 3,92	40,16 ± 4,49
	Парацетамол, 1 г/кг	40,34 ± 4,98	43,16 ± 2,29	39,88 ± 2,50	40,67 ± 4,15
Каталаза, мккат/л	Інтактний контроль	45,77 ± 6,49	48,13 ± 5,86	81,37 ± 1,32	50,27 ± 5,83
	Парацетамол, 1 г/кг	52,05 ± 5,96	44,80 ± 8,24	44,32 ± 9,64*	40,81 ± 8,99
Зміна показника відносно інтактного контролю, %		–	–	↓45 %	–
ТБК-активні продукти, мкмоль/г	Інтактний контроль	26,93 ± 2,24	16,12 ± 4,98	19,74 ± 7,08	34,40 ± 2,85
	Парацетамол, 1 г/кг	28,20 ± 3,74	16,02 ± 3,39	18,37 ± 4,00	31,84 ± 2,70

Примітка. Тут і в табл. 2: *відхилення показника достовірно значущі (p < 0,05) відносно інтактних тварин; n – кількість тварин у групі.

Хронобіологічна характеристика стану системи ПОЛ-АОЗ інтактних тварин та тварин за умов патології (циркадіанний ритм) за програмою Cosinor-Analysis 2.4 for Excel 2000/XP (n = 6–7)

Показник	Інтактний контроль		Парацетамол, 1 г/кг	
	Мезор	Амплітуда	Мезор	Амплітуда
Самиці				
Відновлений глутатіон, у. о	106,33 ± 6,06	35,97 ± 7,15	84,45 ± 8,58	27,14 ± 4,22
Супероксиддисмутаза, у. о	44,20 ± 1,08	5,04 ± 1,66	40,24 ± 2,26	4,50 ± 1,39
Каталаза, мккат/л	55,59 ± 2,06	17,31 ± 2,48	47,49 ± 3,02	0,44 ± 2,01
ТБК-активні продукти, мкмоль/г	22,45 ± 1,18	8,34 ± 1,06	24,36 ± 0,88	9,82 ± 2,00
Самці				
Відновлений глутатіон, у. о.	105,96 ± 6,49	44,23 ± 10,22	68,25 ± 9,48*	45,29 ± 7,54
Супероксиддисмутаза, у. о.	44,97 ± 2,32	4,33 ± 2,06	41,01 ± 1,71	1,27 ± 1,23
Каталаза, мккат/л	55,38 ± 1,74	17,83 ± 2,56	45,49 ± 6,91	4,35 ± 2,70
ТБК-активні продукти, мкмоль/г	24,30 ± 2,85	9,82 ± 1,86	23,61 ± 2,47	9,31 ± 1,67

протягом 1 доби порівняно з інтактними тваринами: акрофази та батифази вмісту ТБК-АП здорових тварин і тварин з патологією зберігаються (21.00 та 09.00 відповідно), а величини мезору та амплітуди не мають суттєвих відмінностей у тварин з патологією відносно інтактних щурів (табл. 1; табл. 2).

Як правило, на тлі патологічного процесу спостерігається суттєве зростання вмісту ТБК-АП відносно фізіологічного рівня [2], відсутність такого за умов даного експерименту можна пояснити тим, що ТБК-АП – вторинні продукти процесів ПОЛ, та за умов моделюваної патології, коли евтаназію тварин проводили через 24 год після введення парацетамолу, пройшло недостатньо часу для утворення саме вторинних продуктів ПОЛ – ТБК-АП. Проте отримані результати додатково підтверджують наявність чіткого циркадіанного ритму вмісту ТБК-АП у гепатоцитах щурів, синхронного у тварин обох статей.

Висновки

1. Уведення токсичної дози парацетамолу призводить до зниження пулу ВГ у тварин обох статей відносно інтактних щурів: у самиць – на 18–20 %, у самців – на 20–48 %. У тварин обох статей на тлі патології періоди акро-

фази та батифази вмісту ВГ аналогічні таким інтактних тварин.

2. Уведення токсичної дози парацетамолу щурам обох статей призводить до десинхронозу циркадіанного ритму активності каталази з нівелюванням виразної акрофази, характерної для інтактних тварин – о 15.00, та зі «згладженням» архітекτονіки ритму – амплітуда зменшується на 97 % у самиць та на 76 % у самок.
3. Уведення токсичної дози парацетамолу не впливає на зміну мезору циркадіанного ритму активності СОД у самиць та самців щурів, однак, амплітуда ритму в самців зменшується в 3,4 рази, що вказує на «згладження» ритму.
4. Реєструється чіткий циркадіанний ритм вмісту ТБК-АП у гепатоцитах щурів, синхронний у тварин обох статей, який не порушується за умов одноразового введення токсичної дози парацетамолу.
5. Аналіз отриманих результатів щодо токсичного впливу парацетамолу на ритм показників системи ПОЛ-АОЗ свідчить про відсутність суттєвих міжстатевих відмінностей у розвитку десинхронозу під впливом даного ксенобіотика в щурів обох статей, за винятком більш виразного зниження рівня ВГ у самців порівняно з самицями.

1. Хронофармакология наглядно (Хронофармакология в таблицах и рисунках): Справочник – учебное пособие / С. М. Дроговоз [и др.]. – Харьков : Титул, 2014. – 128 с.
2. Біохімія: підручник / за загальною редакцією проф. А. Л. Загайко, проф. К. В. Александрової. – Харків : Вид-во «Форт», 2014 – 728 с.
3. *Tong X. Circadian rhythms in liver physiology and liver diseases / X. Tong, L. Yin // Compr Physiol.* – 2013. – № 3. – P. 917–940.
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. док. мед. наук. А. Н. Миронова. – Москва : Гриф и К, 2012. – Ч.1. – 944 с.
6. *Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. / В. С. Камышников. – Минск : Беларусь, 2000. – Т. 1. – 495 с.*
7. *Семеновко С. Б. Особливості структури хроноритмів екскреторної функції нирок за умов гіперфункції шишкоподібної залози / С. Б. Семеновко // Буковинський медичний вісник. – 2014. – Т. 18, № 2 (70). – С. 99–101.*
8. *Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – 3-е изд. / О. Ю. Реброва. – Москва : МедиаСфера, 2006. – 312 с.*
9. *Карп В. П. Вычислительные методы анализа в хронобиологии и хрономедицине / В. П. Карп, Г. С. Катинас. – Санкт-Петербург, 1997. – 115 с.*
10. *Дроговоз С. М. Лекарственная токсикология: учебник-справочник / С. М. Дроговоз, В. Д. Лукьянчук, Б. С. Шейман. – Харьков : Титул, 2015. – 592 с.*

К. О. Калько, С. М. Дроговоз, Н. В. Захарко, Т. К. Юдкевич

Вплив токсичних доз парацетамолу на циркадіанний ритм прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу

Мета дослідження – встановлення циркадіанного ритму системи ПОЛ-АОЗ за фізіологічних умов та її десинхроноз за умов парацетамолового ушкодження печінки. 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 щура. Евтаназію тварин проводили через 24 год після введення ксенобіотика. Циркадіанний ритм системи ПОЛ-АОЗ оцінювали за активністю СОД, каталази, вмісту ВГ і ТБК-АП.

Встановлено, що розвиток гострого парацетамолового гепатиту призводить до десинхронозу системи АОЗ, про що свідчить зміна циркадіанного ритму ключових компонентів АОС. Зокрема, нівелюється добовий ритм активності каталази (амплітуда знижується на 97 % у самиць та на 76 % у самців), тоді як такий у активності СОД зберігається (зменшення мезору ритму відносно інтактних тварин несуттєве: на 9 % у самиць та на 10 % у самців). Зниження вмісту ВГ підтверджується зміною мезору ритму даного показника на 21 % у самок та на 36 % у самців відносно інтактних тварин, тоді як збереження мезору на тлі патології та амплітуди вмісту ТБК-АП, характерного для інтактних тварин, свідчить про відсутність змін даного показника за умов одноразового гострого парацетамолового гепатиту. Отримані результати слід враховувати з метою адекватної оцінки результатів експериментів при вивченні традиційних і перспективних гепатопротекторів.

Ключові слова: печінка, гострий гепатит, парацетамол, циркадіанний ритм, прооксидантно-антиоксидантна система

Е. А. Калько, С. М. Дроговоз, Н. В. Захарко, Т. К. Юдкевич

Влияние токсических доз парацетамола на циркадианный ритм прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза

Цель исследования – установить циркадианный ритм системы ПОЛ-АОЗ в физиологических условиях и ее десинхроноз при парацетамоловом повреждении печени. Исследования проводили на крысах обоих полов на модели острого парацетамолового гепатита, который моделировали в следующие периоды суток: утренний (09.00), дневной (15.00), вечерний (21.00) и ночной (03.00) однократным введением парацетамола в дозе 1000 мг/кг. Эвтаназию животных проводили через 24 ч после введения ксенобіотика. Циркадианный ритм системы ПОЛ-АОЗ оценивали по активности СОД, каталазы, содержанию ВГ и ТБК-АП.

Установлено, что развитие острого парацетамолового гепатита приводит к десинхронозу системы АОЗ, о чем свидетельствуют изменения циркадианного ритма ключевых компонентов АОС. В частности нивелируется суточный ритм активности каталазы (амплитуда снижается на 97 % у самок и на 76 % у самцов), тогда как ритм активности СОД сохраняется (уменьшение мезора ритма относительно интактных животных незначительно: на 9 % у самок и на 10 % у самцов). Снижения содержания ВГ подтверждается изменением мезора ритма данного показателя на 21 % у самок и на 36 % у самцов относительно интактных животных, тогда как сохранение мезора и амплитуды ритма содержания ТБК-АП, характерного для интактных животных, подтверждает отсутствие изменения данного показателя в условиях острого парацетамолового гепатита. Полученные данные следует учитывать для адекватной оценки результатов экспериментов при изучении традиционных и перспективных гепатопротекторов.

Ключевые слова: печень, острый гепатит, парацетамол, циркадианный ритм, прооксидантно-антиоксидантная система

K. O. Kalko, S. M. Drogovoz, N. V. Zakharko, T. K. Yudkevich
**The influence of paracetaminofen toxic dose on circadian rhythm
of prooxidant-antioxidant homeostasis**

The aim of the study was to establish the circadian rhythm of prooxidant- antioxidant system in physiological conditions and it's desynchronization under paracetaminofen liver damage. The study was conducted on rats of both sexes on the model of acute paracetaminofen hepatitis which performed in subsequent periods of day: in the morning (09.00), day (15.00), evening (21.00) and night (03.00) by administration of paracetaminofen at a dose of 1000 mg/kg. The evaluation of circadian rhythm of prooxidant-antioxidant system in animals performed 24 h after administration of xenobiotic on such parameters as SOD and catalase activities and also on the malondialdehyde and reduced glutathione (RG) contents.

It was found that the development of acute paracetaminofen hepatitis leads to the desynchronization of prooxidant-antioxidant system evidenced by changes in circadian rhythm of its key components. In particular, the catalase activity circadian rhythm was leveled (amplitude reduced by 97 % in females and 76 % in males) while the circadian rhythm of SOD activity was kept (decrease of mezos was negligible relative to intact animals: by 9 % in females and 10 % in males). Reduction of RG content confirmed by the changes mezos rhythm of this index by 21 % in females and 36 % in males as to intact animals, while preserving mezos and amplitude rhythm of malondialdehyde content characteristic for intact animals confirms no changes of this indicator in terms of acute paracetaminofen hepatitis. The results obtained should be considered in order to adequately assess the results of experiments during the study of traditional and advanced hepatoprotective drugs.

Key words: liver, acute paracetaminofen hepatitis, circadian rhythm, prooxidant-antioxidant system

Надійшла: 12 жовтня 2015 р.

Контактна особа: Калько Катерина Олександрівна, аспірант з відривом від виробництва, старший лаборант, кафедра фармакології, Національний фармацевтичний університет, буд. 12, вул. Мельникова, м. Харків, 61000. Тел.: + 38 0 96 943 17 94.
Електронна пошта: kalko_sonkina@mail.ru