

К. О. Калько¹, С. М. Дроговоз¹, Д.-М. В. Пазюк²

Циркадіанна залежність впливу карсилу на активність маркерів цитолізу та вміст відновленого глутатіону за умов хронодетермінованого парацетамолового гепатиту

¹Національний фармацевтичний університет, м. Харків²Рівненський державний базовий медичний коледж

Ключові слова: печінка, маркери цитолізу, карсил, хроноефективність

Незважаючи на прогрес в області гепатології та медицини в цілому гепатобіліарні захворювання займають лідируючі позиції серед хвороб органів ШКТ, що зумовлено сучасним стилем життя, якістю продуктів харчування, необґрунтованою поліпрагмацією, екологічною ситуацією та ін. [1, 2]. Гепатопротектори – група препаратів, що часто застосовуються в терапії захворювань гепатобіліарної системи, інтегральний фармакологічний ефект яких визначається комплексом антиоксидантної, мембраностабілізуючої, проти-запальної, детоксикаційної та імуностимулюючої активностей. Виразність ефектів цих препаратів певною мірою залежить від циркадіанних (добових) ритмів діяльності печінки та організму в цілому [3].

Дослідження циркадіанної залежності виразності фармакологічної активності гепатопротекторів допоможе встановити хронопортрети останніх, а врахування хроноособливостей даних препаратів дозволить оптимізувати терапію захворювань печінки та жовчовивідних шляхів. Натепер особливості хронопортретів гепатопротекторів не відомі, що зумовило проведення досліджень з метою їхнього встановлення.

Мета дослідження – встановлення циркадіанної залежності впливу карсилу на активність маркерів цитолізу та вміст відновленого глутатіону (ВГ) за

умов хронодетермінованого парацетамолового гепатиту.

Об'єктом дослідження було обрано рослинний гепатопротектор на основі флавоноїдів розторопші – карсил. Причиною вибору саме даного препарату були його доведена ефективність з позицій доказової медицини (ступеня В та С), суттєвий рівень продажів на ринку України серед інших гепатопротекторів та дані маркетингових досліджень, проведених у країнах Європи, щодо вибору пацієнтами карсилу як найпопулярнішого гепатопротектора для самолікування [4]. Вищенаведене підтверджує актуальність проведення хронофармакологічних досліджень з метою встановлення хронопортрету карсилу.

Матеріали та методи. Циркадіанну залежність впливу карсилу на активність маркерів цитолізу в сироватці крові та вміст відновленого глутатіону в гепатоцитах щурів досліджували у весняний сезон на моделі хронодетермінованого однодобового парацетамолового гепатиту. Тварин утримували в розпліднику ЦНДЛ НФаУ (м. Харків) за стандартних умов температурного режиму, вологості повітря та світлового режиму, що відповідав природній тривалості світлового дня 12–13 год. Модельну патологію викликали одноразовим внутрішньошлунковим введенням парацетамолу в дозі 1000 мг/кг у вигляді суспензії на 2 % крохмальному гелі в наступні години доби: 03.00, 09.00, 15.00 та 21.00. Карсил застосовували в лікувально-профілактичному режимі (за 1 год до введення

парацетамолу та через 2 год після, внутрішньошлунково на індиферентному розчиннику воді) в ефективній діючій дозі 100 мг/кг [5]. В експерименті використано 96 щурів-самиць по 8 особин у кожній з циркадіанних груп: інтактного контролю, модельної патології та тварин, яким вводили карсил. Евтаназію щурів (під тіопенталовим наркозом), забор крові та печінки проводили через 24 год після введення парацетамолу. Ступінь цитотоксичної дії парацетамолу та ефект карсилу оцінювали за маркерами цитолізу гепатоцитів – активністю аланінаміно-трансферази (АлАТ) та аспартатаміно-трансферази (АсАТ) у сироватці крові та за вмістом ВГ, ураховуючи участь його в процесах біотрансформації токсичних метаболітів парацетамолу [6]. Уміст відновленого глутатіону (ВГ) визначали в гомогенаті печінки за модифікованим методом G. L. Ellman [7], активність трансаміназ у сироватці крові – за реакцією Райтмана-Френкеля з використанням стандартних наборів виробництва НВП «Філісіт-Діагностика» (Україна) [8].

З метою нівелювання впливу світлового фактора на синтез мелатоніну у вечірній та нічний період досліди проводили під інфрачервоною лампою [9]. Дані обробляли статистично за допомогою програми «Statistica 8,0». Використовували непараметричний критерій Манна-Уїтні. У разі порівняння статистичних показників було прийнято рівень значущості $p < 0,05$ [10].

Усі маніпуляції та евтаназію тварин проводили відповідно до міжнародних та національних вимог (Страсбург, 1986 р., Київ, 2001 р.) [11]. Протокол дослідження схвалено локальним етичним комітетом (протокол від 18 березня 2015 р. № 3).

Результати та їх обговорення. Відомо, що токсичність парацетамолу залежить від часу доби, коли відтворюється модель даного гепатиту, що свідчить про циркадіанну залежність його токсичної дії [12]. Найбільшу токсичну дію парацетамолу за вищевказаними критеріями спостерігали при моделюванні патології в ранковій (09.00) та вечірній (21.00) години: реєстрували

достовірне зростання активності АлАТ у 2,5 та 3,4 разу і АсАТ – у 3,0 та 3,4 разу відносно відповідних циркадіанних груп інтактного контролю (таблиця). Саме в дані періоди введення карсилу в лікувально-профілактичному режимі сприяло зменшенню активності АлАТ та АсАТ у 1,4 та 1,5 разу в ранковий період і в 1,4 та 1,2 разу у вечірній відповідно. Також, слід зазначити, що в ранковий та вечірній періоди реєструється зростання вмісту ВГ у 1,2 разу при застосуванні карсилу порівняно з показником тварин групи контрольної патології (таблиця).

Уведення карсилу не сприяло зменшенню активності трансаміназ на тлі патології в денний та нічний періоди, коли моделювання парацетамолового гепатиту характеризувалося мінімальним розвитком цитолізу порівняно з іншими циркадіанними періодами (таблиця). Теж саме спостерігали з вмістом ВГ, який не змінювався під дією препарату в дані періоди порівняно з показниками тварин групи контрольної патології (таблиця). Вищезазначене ймовірно пов'язано з хронофармакодинамічними особливостями прояву антиоксидантної та мембраностабілізуючої активності карсилу.

Результати проведеного експерименту підтверджують наявність добових піків максимальної (акрофази) та мінімальної (бати фази) фармакологічної ефективності карсилу, яка залежить від виразності ступеня патологічного процесу, що в свою чергу зумовлено впливом циркадіанних ритмів ендogenous та екзогенного характеру. Таким чином, акрофазу (найбільш виразна) активності карсилу при його застосуванні в лікувально-профілактичному режимі на тлі хронодетермінованого парацетамолового гепатиту спостерігали в ранковий та вечірній періоди, тоді як бати фази (мінімальна виразність) – в денний та нічний.

Особливості циркадіанної дії карсилу відповідають загальним принципам хронофармакології: найбільша виразність фармакологічного ефекту препарату проявляється в період значного порушення функції органу [13].

Циркадіанна залежність активності маркерів цитолізу в сироватці крові й рівня відновленого глутатіону в тканині печінки за умов хронодетермінованого парацетамолового гепатиту та впливу карсилу, $M \pm m$ ($n = 8$)

	Експериментальна група	Активність АлАТ, мкмоль/год • мл	Активність АсАТ, мкмоль/год • мл	Уміст ВГ, ум. од.
03.00	Інтактний контроль	0,97 ± 0,12	0,74 ± 0,16	87,52 ± 8,25
	Гепатит (контрольна патологія)	1,68 ± 0,33	1,86 ± 0,22*	70,02 ± 19,78
	Зміна показника за умов патології (рази)	↑1,7	↑2,5*	–
	Гепатит + карсил	1,87 ± 0,06	1,66 ± 0,10	72,92 ± 13,40
	Зміна показника в разі застосування карсилу (рази)	–	–	–
09.00	Інтактний контроль	0,94 ± 0,05	0,75 ± 0,09	105,21 ± 11,65
	Гепатит	2,36 ± 0,44*/*	2,25 ± 0,23*/*	75,49 ± 12,45*
	Зміна показника за умов патології (рази)	↑2,5*	↑3,0*	↓1,4
	Гепатит + карсил	1,46 ± 0,17	1,42 ± 0,17**	93,72 ± 10,25
	Зміна показника в разі застосування карсилу (рази)	↓1,4	↓1,4**	↑1,2
15.00	Інтактний контроль	1,19 ± 0,09#	0,95 ± 0,05#	154,25 ± 13,52#
	Гепатит	1,26 ± 0,10	1,44 ± 0,17*	123,84 ± 8,57*
	Зміна показника за умов патології (рази)	–	↑1,5*	↓1,2
	Гепатит + карсил	1,06 ± 0,11	1,50 ± 0,08	110,19 ± 6,80
	Зміна показника в разі застосування карсилу (рази)	↓1,2	–	–
21.00	Інтактний контроль	0,87 ± 0,05	0,51 ± 0,09	78,33 ± 14,54
	Гепатит	2,92 ± 0,22*/*	1,75 ± 0,23*	68,45 ± 16,93*
	Зміна показника за умов патології (рази)	↑3,4*	↑3,4*	↓1,1
	Гепатит + карсил	1,54 ± 0,17**	1,35 ± 0,07	82,41 ± 12,21
	Зміна показника в разі застосування карсилу (рази)	↓1,5**	↓1,2	↑1,2

Примітка. n – кількість тварин у групі; *відхилення показника достовірно значуще відрізняється від показника інтактних тварин ($p < 0,05$); **відхилення показника достовірно значуще відрізняється від показника в групі тварин з гепатитом ($p < 0,05$); #відхилення показника достовірно значуще відрізняється від мінімального показника в групі інтактних тварин ($p < 0,05$); *відхилення показника достовірно значуще відрізняється від мінімального показника в групі тварин з гепатитом ($p < 0,05$).

Висновки

1. Максимальне зниження активності маркерів цитолізу та зростання вмісту ВГ під дією карсилу на тлі хронодетермінованого парацетамолового гепатиту спостерігали в ранковий та вечірній періоди.
2. На тлі мінімального циркадіанного збільшення активності маркерів цитолізу за умов парацетамолового гепатиту введення карсилу не зміню-

вало величину активності АлАТ та АсАТ і вміст ВГ.

3. Циркадіанна залежність здатності карсилу зменшувати активність маркерів цитолізу та впливати на вміст ВГ на тлі хронодетермінованого парацетамолового гепатиту ймовірно зумовлена хронофармакодинамічними особливостями реалізації антиоксидантної і мемраностабілізуючої дії препарату.

1. Влияние препарата глутаргин на клинико-биохимические показатели у больных острым вирусным гепатитом А / А. О. Соломенник, Е. В. Юрко, Е. И. Могиленец, К. И. Никитина // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2010 – № 4. – С. 107–109.
2. Tong X. Circadian rhythms in liver physiology and liver diseases / X. Tong, L. Yin // Compr Physiol. – 2013. – № 3. – P. 917–940.
3. Дроговоз С. М. Фармакологія в помощь студенту, провизору и врачу: учебник-справочник / С. М. Дроговоз, С. Ю. Штриголь, Е. Г. Щекина. – Харьков : Титул, 2013. – 900 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. док. мед. наук. А. Н. Миронова. – Москва : Гриф и К, 2012. – Ч. 1. – 944 с.
6. Біохімія: підручник / за загальною редакцією проф. А. Л. Загайко, проф. К. В. Александрової. – Харків : Вид-во «Форт», 2014 – 728 с.
7. Пустовалова Л. М. Практикум по биохимии / Л. М. Пустовалова. – Ростов на Дону : Феникс, 1999. – 544 с.
8. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. / В. С. Камышников. – Минск : Беларусь, 2000. – Т. 1. – 495 с.
9. 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.
10. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA – [3 изд.] / О. Ю. Реброва. – Москва : МедиаСфера, 2006. – 312 с.
11. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації / За ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. – Київ : ВД «Авіцена», 2001. – 528 с.
12. 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.
13. Хронофармакологія наглядно (Хронофармакологія в таблицях и рисунках): Справочник – учебное пособие / С. М. Дроговоз [и др.]. – Харьков : Титул, 2014. – 128 с.

К. О. Калько, С. М. Дроговоз, Д-М.В. Пазюк

Циркадіанна залежність впливу карсилу на активність маркерів цитолізу та вміст відновленого глутатіону за умов хронодетермінованого парацетамолового гепатиту

Мета дослідження – встановлення циркадіанної залежності впливу карсилу на активність маркерів цитолізу та вміст відновленого глутатіону (ВГ) за умов хронодетермінованого парацетамолового гепатиту. Оскільки в патогенезі пошкоджуючої дії парацетамолу спостерігається зростання активності маркерів цитолізу в сироватці крові та зменшення вмісту ВГ у гепатоцитах, то саме за ступенем зміни величин вищевказаних показників під дією препарату можна оцінити виразність прояву ним антиоксидантної та мембранопротекторної активностей, які є ключовою складовою гепатопротекторного ефекту. Дослідження проводили на самицях щурів на моделі гострого парацетамолового гепатиту, який відтворювали одноразовим введенням парацетамолу (1000 мг/кг внутрішньошлунково) у наступні періоди доби: ранковий (09.00), денний (15.00), вечірній (21.00) та нічний (03.00). Карсил вводили в лікувально-профілактичному режимі в дозі 100 мг/кг внутрішньошлунково за 1 год до введення парацетамолу та через 2 год після нього. Активність маркерів цитолізу в сироватці крові та вміст ВГ у тканині печінки визначали через 24 год після введення ксенобіотика.

Встановлено, що максимальне зниження активності маркерів цитолізу та зростання вмісту ВГ під дією карсилу на тлі хронодетермінованого парацетамолового гепатиту спостерігається в ранковий та вечірній періоди. На тлі мінімального циркадіанного збільшення активності маркерів цитолізу за умов парацетамолового гепатиту введення карсилу не змінювало величину активності АлАТ та АсАТ і вмісту ВГ. Циркадіанна залежність здатності карсилу зменшувати активність маркерів цитолізу та впливати на вміст ВГ на тлі хронодетермінованого парацетамолового гепатиту ймовірно зумовлена хронофармакодинамічними особливостями реалізації антиоксидантної й мембраностабілізуючої дії даного препарату. Особливості циркадіанної дії карсилу відповідають загальним принципам хронофармакології: найвиразніший фармакологічний ефект препарату проявляється в період значного порушення функції органу.

Ключові слова: печінка, маркери цитоліза, карсил, хроноефективність

Е. А. Калько, С. М. Дроговоз, Д-М. В. Пазюк

Циркадіанна залежність впливу карсилу на активність маркерів цитолізу та вміст відновленого глутатіону в умовах хронодетермінованого парацетамолового гепатиту

Цель исследования – определение циркадианной зависимости влияния карсила на активность маркеров цитоліза и содержание восстановленного глутатиона (ВГ) в условиях хронодетермини-

рованного парацетамолового гепатита. Поскольку в патогенезе повреждающего действия парацетамола наблюдается увеличение активности маркеров цитолиза в сыворотке крови и уменьшение содержания ВГ в гепатоцитах, то именно по степени изменения величин вышеуказанных показателей под действием препарата можно оценить выраженность проявления им антиоксидантной и мембранопротекторной активностей, которые являются ключевыми составляющими гепатопротекторного эффекта. Исследования проводили на самках крыс на модели острого парацетамолового гепатита, который воспроизводили однократным внутривентрикулярным введением парацетамола в дозе 1000 мг/кг в такие периоды суток: утренний (09.00), дневной (15.00), вечерний (21.00) и ночной (03.00). Карсил вводили внутривентрикулярно в дозе 100 мг/кг в лечебно-профилактическом режиме за 1 час до введения парацетамола и через 2 часа после. Определение активности маркеров цитолиза в сыворотке крови и содержания восстановленного глутатиона в ткани печени осуществляли через 24 ч после введения ксенобиотика.

Установлено, что максимальное снижение активности маркеров цитолиза и увеличение уровня ВГ под действием карсила на фоне хронодетерминированного парацетамолового гепатита наблюдается в утренний и вечерний периоды. На фоне минимального циркадианного увеличения активности маркеров цитолиза в условиях парацетамолового гепатита введение карсила не изменяло величину активности АлАТ и АсАТ и содержание ВГ. Особенности циркадианного действия карсила соответствуют общим принципам хронофармакологии: наибольшая выраженность фармакологического эффекта препарата проявляется в период значительного нарушения функции органа.

Ключевые слова: печень, маркеры цитолиза, карсил, хроноэффективность

K. O. Kalko, S. M. Drogovoz, D-M. V. Paziuk

Circadian dependence of karsil effect on the cytolysis markers activity and reduced glutathione content under time-determined paracetamol hepatitis

Aim of the study is the definition of circadian dependence of karsil effect on the cytolysis markers activity and content of reduced glutathione (RG) under the condition of time-determined paracetamol hepatitis. Because on the pathogenesis of the paracetamol damaging effect an increasing activity of cytolysis markers in the blood serum and decreasing of RG content in hepatocytes are observed, the degree of changes the above mentioned indicators under the influence of the karsil make it possible to assess key components of it's hepatoprotective effect: the parameters of antioxidant and membrane protective activities. The study was conducted on female rats using the model of acute paracetamol hepatitis that reproduced by the single intragastrical administration of paracetamol (1000 mg/kg) in such day periods: morning (09.00), day (15.00), evening (21.00) and night (03.00). Karsil (100 mg/kg) was administered in therapeutic and preventive mode, i. e. 1 hour before the administration of paracetamol and 2 hours after. The determination of cytolysis markers activity in the blood serum and content of reduced glutathione in liver tissue of animals was carried out 24 hours after administration of the xenobiotic.

It was found that the maximum decreasing of the cytolysis markers activity and increasing of the RG level under karsil on the background of time-determined paracetamol hepatitis were observed in the morning and evening periods. Against the background of minimal circadian increasing of the cytolysis markers activity under paracetamol hepatitis the administration of karsil did not change the magnitude of ALT and AST activity and the content of RG. Features of karsil circadian action consistent with the general chronopharmacology principles: the greatest intensity of the pharmacological effect of the drug manifests in a period of significant organ dysfunction.

Key words: liver, cytolysis markers, karsil, chronoeffectiveness

Надійшла: 21 січня 2016 р.

Контактна особа: Калько К. О., Національний фармацевтичний університет, буд. 12, вул. Мельникова, м. Харків. Тел.: + 38 0 96 943 17 94. Електронна пошта: kalko_sonkina@mail.ru