УДК 616.36-099:546.173-085.212-06:612.015.11]-092.9

Л. О. Пацкань, І. М. Кліщ
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

ВПЛИВ ПАРАЦЕТАМОЛУ НА АКТИВНІСТЬ ПРОЦЕСІВ ЛІПОПЕРОКСИДАЦІЇ І СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ЩУРІВ НА ТЛІ ТРИВАЛОГО ЗАСТОСУВАННЯ НІТРИТІВ

Досліджено вплив парацетамолу на активність процесів ліпідної пероксидації і показники антиоксидантної системи на фоні тривалого введення натрію нітриту. Встановлено, що прогресування патологічного процесу в печінці супроводжується інтенсифікацією процесів вільнорадикального окиснення, спричиняє істотне порушення компенсаторних механізмів, особливо стану ферментної та неферментної ланок антиоксидантної системи.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **парацетамол, пероксидне окиснення ліпідів, антиоксидантна система, гепатотоксичність, нітрити.**

ВСТУП. Більшість захворювань супроводжується болем, отже, анальгетики, особливо ненаркотичні, становлять категорію ліків найбільш широкого використання. Парацетамол (ПА) – засіб, який широко застосовують у фармакотерапії, як самостійно, так і в складі комбінованих препаратів. Незважаючи на те, що його вважають досить безпечним, за останні 10 років накопичено велику кількість даних щодо токсичної дії ПА, і ця проблема для багатьох країн є досить актуальною. Так, отруєння АФ складають 5 % від загальної кількості інтоксикацій у США [12, 16], а за смертністю дітей внаслідок отруєння ПА, наприклад у 1995 р., він займає третє місце [11]. Аналогічні дані зареєстровані медиками Великої Британії, Франції та Австралії [9, 14, 15]. Причинами розвитку гострої печінкової недостатності є порушення метаболізму ПА внаслідок індукції цитохромів Р-450, перш за все ізоформи Р-450 2Е1, та активація монооксигеназ ендоплазматичного ретикулума печінки, що супроводжується зниженням її антиоксидантного статусу. Це спричиняє накопичення високореактивних метаболітів та активних форм кисню, здатних взаємодіяти з органелами клітин печінки, ініціюючи їх пошкодження і некроз [13].

Аналіз даних літератури свідчить про те, що не лише передозування ПА, але й застосування його в терапевтичних дозах протягом тривалого часу, використання хворими на діабет, гепатити різної етіології, алкоголізм, а також за умов незбалансованості харчування, тривалого контакту з хімічними сполуками органічного і нерганічного походження в промисловості та побуті призводять до гострого ураження печінки [13, 14].

Серед таких чинників важливе місце належить нітратам і нітритам. Проблема впливу нітратів на організм людини і тварин залишається актуальною у зв'язку з підвищенням вмісту нітросполук у навколишньому середовищі. Нітрати, що надходять в організм у великій кількості, викликають токсичний ефект, причому токсичними є не тільки самі нітрати, але й речовини, на які вони можуть перетворюватися (нітрити, нітрозаміни). У сучасних дослідженнях показано, що навіть набагато нижчі від встановлених гранично допустимих концентрації нітратів і нітритів можуть проявити виражену біологічну дію, здебільшого негативну [1]. Йдеться про так звані надфонові концентрації нітратів і нітритів. Поняття фонової концентрації нітрат-аніонів у питній воді істотно відрізняється для різних регіонів залежно від інтенсивності використання мінеральних добрив і ряду інших чинників. Для Подільського регіону звичайною вважають концентрацію нітратів у воді 30–50 мкмоль/л. Але нерідко спостерігається підвищення її до 0,1–0,15 ммоль/л. Ці значення в даному випадку і є надфоновими [2].

Як антидоти при отруєнні ПА використовують попередники біосинтезу глутатіону (метіонін, *N*-ацетилцистеїн). Але обмеженість термінів їх ефективності (10–12 год після отруєння) та реалізація детоксикуючої дії лише

© Л. О. Пацкань, І. М. Кліщ, 2012.

в межах другої фази детоксикації є недоліком, що вимагає пошуку засобів, здатних проявляти поліфункціональні властивості: запобігати утворенню реактивних метаболітів, сприяти глутатіонозалежній кон'югації та проявляти антиоксидантну активність. Це дозволило б значно розширити спектр застосування ПА та зменшити прояви його побічної дії [9].

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проводили на білих статевозрілих щурах-самцях масою 180–200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію при вільному доступі до води.

Токсичне ураження викликали шляхом дворазового внутрішньошлункового введення тваринам суспензії парацетамолу у 2 % розчині крохмалю в дозі 1250 мг/кг маси тіла (1/2 LD_{50}). Перед цим тваринам вводили натрію нітрит у дозі 25 мг/кг внутрішньошлунково протягом 7-ми діб.

Піддослідних щурів поділили на 3 групи: 1-ша – інтактні (контроль); 2-га – уражені парацетамолом; 3-тя – уражені парацетамолом після попереднього введення натрію нітриту.

Тварин виводили з експерименту на 1-шу, 3-тю і 5-ту доби з моменту припинення ураження шляхом евтаназії за умов тіопенталового наркозу. Всі експерименти на щурах проводили відповідно до Науково-практичних рекомендацій з утримання лабораторних тварин та роботи з ними [7].

Досліджували цільну кров, сироватку крові й гомогенат печінки. Концентрацію дієнових кон'югатів (ДК) визначали методом, описаним у роботі [4], ТБК-активних продуктів – за методикою [4], активність супероксиддисмутази (СОД) – за методикою [8], каталазну активність – за методикою [6], концентрацію церулоплазміну (ЦП) – за методикою [3]. Стан глутатіонової ланки антиоксидантної системи вивчали за активністю глутатіонпероксидази (ГП) і глутатіонредуктази (ГР) [5] та вмістом відновленого глутатіону (Г-SH), який визначали згідно з методикою G. L. Ellman [10]. Кількісні показники обробляли статистично. Достовірність різниці між порівнюваними величинами визначали за t-критерієм Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Отримані нами результати вказують на те, що інтоксикація тварин ацетамінофеном супроводжувалась активацією вільнорадикального окиснення ліпідів у сироватці крові та печінці щурів, про що свідчило достовірне збільшення вмісту ДК у сироватці крові та печінці протягом усього експерименту (табл.). Зокрема, на 1-шу добу після останнього введення ПА вміст ДК у сироватці крові щурів 2-ї групи був у 2,1 раза більшим за аналогічний показник інтактних тварин. До 3-ї доби ми зафіксували незначне його зниження порівняно з 1-ю добою, однак показник перевищував норму в 1,9 раза. На 5-ту добу дослідження вміст ДК далі зростав і становив 225 % від рівня інтактних тварин. Подібні зміни було отримано і в печінці: збільшення, відповідно, в 1,3 раза на 1-шу, в 2,6 – на 3-тю і в 3,1 – на 5-ту доби після введення ПА. У печінці уражених тварин вміст ДК зростав аналогічно і становив на 1-шу добу 30 % від норми, на 3-тю і 5-ту – 264 і 307 % відповідно. Аналогічне зростання відмічено також щодо проміжного метаболіту ланцюга ліпідної пероксидації – малонового діальдегіду, який визначали у тесті з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-активні продукти). У плазмі крові показник становив 148, 254, 285 % у відповідні терміни спостереження, що достовірно вище, ніж у нормі. Така ж тенденція зберігалась і в печінці.

У групі тварин, яким парацетамол вводили на фоні субхронічної інтоксикації натрію нітритом, ми зафіксували значно вищі показники інтенсивності ліпідної пероксидації на 1-шу і 3-тю доби дослідження. У плазмі крові щурів 3-ї групи показники ДК становили 235 і 253 % від норми в обрані нами терміни дослідження, що достовірно більше від інтактних тварин, а також щурів 2-ї групи. На 5-ту добу зафіксовано зниження вмісту ДК порівняно з тваринами 2-ї групи, однак він був достовірно вищим від рівня здорових щурів. Таку ж тенденцію відмічали і в печінці. Концентрація ТБК-активних продуктів у тварин 3-ї групи також зростала значно інтенсивніше, ніж у 2-й групі. Зокрема, у плазмі крові ми відмітили зростання у 2,3 раза на 1-шу добу, в 3,8 раза – на 3-тю і в 3,2 раза – на 5-ту доби дослідження. У печінці показник також становив 225, 284 і 266 % від норми. Причиною потенціювання токсичної дії парацетамолу нітритами, ймовірно, є пригнічення антиоксидантної системи внаслідок виснаження глутатіонової ланки, оскільки метаболізм нітритів здійснюється з участю відновленого глутатіону [1]. Тому наступним завданням було дослідження стану антиоксидантної системи як за токсичного ураження парацетамолом, так і після субхронічної нітритної інтоксикації. Отримані нами результати вказують на суттєві порушення в системі антиоксидантного захисту за умов токсичного ураження парацетамолом.

Активність СОД у крові та печінці за дії ПА становила на 1-шу добу 77 %, на 3-тю – 73 %,

на 5-ту – 84 % від норми. У печінці спостерігались аналогічні зміни. Зменшення активності СОД, імовірно, є ознакою пригнічення синтезу ферменту. Ще більше зниження ми зафіксували після інтоксикації ПА після попереднього введення нітритів. У плазмі крові ензимна активність зменшувалась на 1-шу добу в 1,5 раза, на 3-тю – в 1,7 раза і до 5-ї доби залишалась на цьому ж рівні. Ще більших змін зазнавала супероксиддисмутазна активність у печінці: зниження на 1-шу добу в 2,3 раза, на 3-тю – в 2,7 раза, на 5-ту – в 2,6 раза. Зміни були достовірними відносно інтактних і тварин 2-ї групи. Поряд з основною причиною, тобто різким пригніченням процесів транскрипції і трансляції в гепатоцитах, вагомим чинником інгібування активності СОД під впливом ПА після попереднього введення натрію нітриту може бути надмірне збільшення у клітинах концентрації синглетного кисню, пероксиду водню, гідроксильних радикалів, гідропероксидів, що призводить до незворотного відновлення міді в активному центрі ферменту або ж окиснення в ньому деяких функціональних груп, зокрема тіолових.

Для забезпечення повноцінної захисної функції СОД необхідні механізми, які б знешкоджували пероксид гідрогену, оскільки акумуляція H_2O_2 в клітині значно інгібує даний фермент. Каталізує реакцію розкладання пероксиду гідрогену до води і, таким чином, разом із СОД ще на стадії зародження блокує ланцюг пероксидного окиснення фермент каталаза. У групі щурів, яким моделювали гостре отруєння ацетамінофеном, спостерігали достовірне зниження активності каталази у крові: в 1,5 раза – на 1-шу, в 2,2 раза – на 3-тю і у 2 рази – на 5-ту доби дослідження. При попередньому введенні нітритів відмічали значно більше пригнічення ензимної активності у крові – показник становив 28, 31 і 37 % від рівня здорових тварин. Каталазна активність у печінці також достовірно знижувалась, причому більш виражено в щурів 3-ї групи з максимумом на 3-тю добу (показник склав 35 % від норми).

Таблиця – **Показники активності ліпідної пероксидації і стану антиоксидантної системи білих щурів за умов гострого токсичного ураження ацетамінофеном та при попередньому введенні натрію нітриту (M±m)**

Показник	Досліджуваний аналіт	Група тварин						
		інтактні, n=8	уражені парацетамолом			парацетамол після семиденного введення натрію нітриту		
			1-ша доба, n=6	3-тя доба, n=6	5-та доба, n=6	1-ша доба, n=6	3-тя доба, n=6	5-та доба, n=6
ДК, $\cdot 10^3$ ум. од./л	Сироватка крові	2,04±0,04	4,29± 0,38*	3,99± 0,15*	4,59± 0,49*	4,79±0,14	5,17± 0,07**	4,39±0,04
ДК, $\cdot 10^3$ ум. од./кг	Гомогенат печінки	0,86±0,03	1,12± 0,06*	2,27± 0,02*	2,64± 0,03*	1,61± 0,03**	2,39± 0,032**	2,43± 0,33
ТБК-активні продукти, мкмоль/л	Плазма крові	4,75±0,14	7,05± 0,31*	12,05± 0,58*	13,54± 0,68*	10,72± 0,78**	17,94± 0,63**	14,89± 0,46
ТБК-активні продукти, мкмоль/кг	Гомогенат печінки	1,16±0,07	1,66± 0,20*	2,95±0,34*	2,34± 0,09*	2,61± 0,17**	3,29±0,03	3,08± 0,08**
СОД, ум. од./л	Кров	0,62± 0,006	0,48± 0,005*	0,45± 0,005*	0,52± 0,007*	0,41± 0,005**	0,36± 0,005**	0,45± 0,013**
СОД, ум. од./кг	Гомогенат печінки	3,88±0,2	3,36± 0,16	2,82±0,14*	2,97± 0,24*	1,69± 0,24**	1,43± 0,07**	1,49± 0,06**
Каталаза, мкат/л	Кров	0,153± 0,011	0,103± 0,005*	0,069± 0,004*	0,075± 0,007*	0,043± 0,008**	0,048± 0,006**	0,057± 0,005
Каталаза, мкат/кг	Гомогенат печінки	5,79±0,23	4,68± 0,24*	3,1±0,18*	3,22±0,27*	2,72± 0,37**	2,01± 0,19**	2,82±0,16
Церулоплазмін, мг/л	Плазма крові	246,4±5,6	183,9± 10,7*	138,9±15*	143,3±6,9*	156,2±6**	123,7±2,1	130,4±5,3
ГП, ммоль/(хв·кг)	Гомогенат печінки	1,036± 0,015	0,996± 0,025	0,694± 0,027*	0,452± 0,025*	0,71± 0,018**	0,513± 0,008**	0,407± 0,009
ГР, ммоль/(хв·кг)	Гомогенат печінки	13,15±0,41	10,2± 0,51*	7,51± 0,74*	3,72±0,16*	7,05± 0,38**	4,58± 0,12**	2,51± 0,24**
ВГ, ммоль/кг	Гомогенат печінки	3,99±0,15	3,35± 0,14*	3,04± 0,21*	1,9±0,18*	2,91± 0,04**	2,48± 0,03**	1,72± 0,007

Примітка. * – різниця достовірна відносно інтактних тварин; ** – різниця достовірна відносно тварин, уражених парацетамолом.

Важлива роль у знешкодженні супероксиданіонрадикалів у плазмі крові належить ЦП, вміст якого протягом усього експерименту знижувався. У плазмі крові щурів 3-ї групи показник становив 63, 50 і 53 % від рівня здорових тварин, достовірно відрізняючись від нього.

Останньою ланкою захисту клітин від переокиснення є система глутатіону, яка включає ферменти ГП та ГР, а також неферментний компонент – Г-SH. За дії ацетамінофену активність ГП зменшувалась відносно контрольних тварин і до 5-ї доби складала 44 % від норми. Попереднє введення натрію нітриту спричинило ще більше зниження глутатіонпероксидазної активності вже з 1-ї доби після завершення токсичної дії патогенних чинників. Показник становив 69 % від норми проти 97 % у тварин, в яких парацетамолове ураження моделювали без попереднього введення натрію нітриту. Спостерігали також зниження ГР протягом усього експерименту, причому попереднє введення нітритів призвело до більш виражених змін цього показника, і до 5-ї доби він становив лише 19 % від норми, що достовірно менше, ніж у тварин 2-ї групи. Зважаючи на ці зміни, логічним є також отримане нами зменшення концентрації Г-SH. При гострому ураженні ПА показник становив 84, 76 і 48 % від норми у відповідні терміни дослідження, а за попереднього введення натрію нітриту він ще більше знижувався і складав 73, 62 і 43 % від рівня інтактних тварин. За даними ряду авторів, головною причиною пригнічення активності ГП і ГР при токсичному ураженні печінки є порушення синтезу їх апоферментів внаслідок деструктивної дії ксенобіотиків на мембрани ендоплазматичної сітки і рибосоми [14]. Зменшення вмісту Г-SH за умов парацетамолового гепатиту також може бути наслідком порушення його синтезу з метіоніну в печінці. Відомо, що процеси біосинтезу цистеїну з метіоніну і глутатіону з цистеїну, а також утворення НАДФ•Н, глюкозо-6-фосфату, біологічно активних сполук двовалентного селену та інших субстратів, необхідних для функціонування ГП і ГР, є АТФ-залежними. А беручи до уваги отримані рядом авторів даних, що під впливом парацетамолу значно порушуються біоенергетичні процеси і зменшується вміст АТФ у печінці, правомірно вважати, що порушення мітохондріального окиснення відіграє суттєву роль у механізмах пригнічення системи глутатіонпероксидази.

Аналізуючи отримані результати, можна констатувати, що попереднє введення натрію нітриту в субтоксичній дозі призводить до більш виражених змін вільнорадикального окиснення ліпідів і системи антиоксидантного захисту, ніж гостре отруєння парацетамолом.

ВИСНОВОК. Гостре отруєння парацетамолом після семиденного введення натрію нітриту в субтоксичній дозі призводить до вираженої активації процесів ліпопероксидації на фоні пригнічення ферментної і неферментної ланок антиоксидантної системи.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ажипа Я. И. Экономические и медико-биологические аспекты проблемы загрязнения окружающей среды нитратами и нитритами / Я. И. Ажипа, В. П. Реутов, Л. П. Каюшин // Физиология человека. – 1990. – **16**, № 3. – С. 131–149.

2. Беспамятнов Г. П. Предельно допустимые концентрации химических веществ в окружающей среде : справочник / Г. П. Беспамятнов, Ю. А. Кротов. – Л. : Химия, 1985. – 528 с.

3. Колб В. Г. Справочник по клинической химии / В. Г. Колб, В. С. Камышников. – М. : Минск, 1982. – 311 с.

4. Колесова О. Е. Перексидное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах / О. Е. Колесова, А. А. Маркин, Т. Н. Федорова // Лаб. дело. – 1984. – № 9. – С. 540–546.

5. Кругликова Г. О. Глутатіонпероксидазна та глутатіонредуктазна активність печінки щурів після введення селеніту натрію / Г. О. Кругликова, Ц. М. Штутман // Укр. біохім. журн. – 1976. – **48**, № 2. – С. 227–233.

6. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова [и др.] // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–18.

7. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / [Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко та ін.]. – К. : Авіцена, 2002. – 156 с.

8. Чевари С. Роль супероксидредуктазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологическом материале / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678–681.

9. Acetaminophen induced hepatotoxicity / S. D. Cohen, D. J. Hoivik, E. A. Khairallah // Toxicology of the Liver. – Raven Press, New York, 1998. – P. 159–186.

10. Ellman G. L.Tissue sulfhydryl groups / G. L. Ellman // Arch. Bioch.Biophys. – 1959. – № 82. – P. 70–77.

11. Hanzlick R. National Association of Medical Examiners Pediatric Toxicology (PedTox) Registry Report 3. Case submission summary and data for acetaminophen, benzene, carboxyhemoglobin, dextromethorphan, ethanol, phenobarbital, and pseudoephedrine / R. Hanzlick // Am. J. Forensic Med. Pathol. – 1995. – **16**(4). – P. 270–277.

12. Lee W. M. Acute liver failure / W. M. Lee // Clinical Perspectives in Gastroenterology. – 2001. – P. 101–110.

13. Lieber C. S. Cytochrome P-4502E1: its physiological and pathological role / C. S. Lieber // Physiological reviews. – 1997. – **77**, № 2. – P. 518–544.

14. Major upper gastrointestinal tract bleeding relation to the use of aspirin and other nonnarcotic analgesics / M. Levy, D. R. Miller, D. W. Kaufman, [et al.] // Arch. Intern. Med. – 1988. – **148**. – P. 281–285.

15. Outcome of acetaminophen-induced liver failure in the USA in suicidal vs accidental overdose: Preliminary results of a prospective multi-center trial / A. M. Larson, G. Ostapowicz, R. J. Fontana [et al.]// Hepatology. – 2000. – **32**(4 pt 2). – P. 396.

16. Slone Epidemiology Unit. Prepared for McNeil Consumer Healthcare. Analgesic use in the adult population of the United States: Acetaminophen, aspirin, ibuprofen and naproxen. Results of a population-based telephone survey, 1998-2001. Report on file, 2001.

Л. А. Пацкань, И. Н. Клищ
ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

ВЛИЯНИЕ ПАРАЦЕТАМОЛА НА АКТИВНОСТЬ ПРОЦЕССОВ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ И СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ КРЫС НА ФОНЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ НИТРИТОВ

Резюме

Исследовано влияние парацетамола на фоне длительного введения натрия нитрита на активность процессов липидной пероксидации и показатели антиоксидантной системы. Установлено, что прогрессирование патологического процесса в печени сопровождается интенсификацией процессов свободнорадикального окисления, влечет существенное нарушение компенсаторных механизмов, особенно состояния ферментного и неферментного звеньев антиоксидантной системы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **парацетамол, пероксидное окисление липидов, антиоксидантная система, гепатотоксичность, нитриты.**

L. O. Patskan, I. M. Klishch
I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

THE IMPACT OF PARACETAMOL ON THE LIPID PEROXIDATION ACTIVITY PROCESSES AND ON THE STATE OF ANTIOXIDATIVE SYSTEM OF THE RATS ON THE BACKGROUND OF PROLONGED USE OF NITRITE

Summary

The influence of paracetamol on a lipid peroxidation activity processes and antioxidant system parameters on the background of prolonged use of sodium nitrite were investigated. Also there was found that the progression of the pathological process in the liver accompanied by intensification of free radical oxidation, wich causing a deviation of compensatory mechanisms, especially the state of fermental and nonfermental links of the antioxidant system.

KEY WORDS: **paracetamol, lipid peroxidation, antioxidant system, hepatotoxicity, nitrites.**

Отримано 23.03.12

Адреса для листування: *Л. О. Пацкань, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна.*