

Міністерство охорони здоров'я України
Національний фармацевтичний університет

КАЛЬКО КАТЕРИНА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 615.451.16:582.734.3:581.45

ХРОНОФАРМАКОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВНОСТІ
ГЕПАТОПРОТЕКТОРНИХ ЗАСОБІВ

14.03.05 – фармакологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук

Харків – 2017

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі фармакології Національного фармацевтичного університету МОЗ України, м. Харків.

Науковий керівник: кандидат фармацевтичних наук
КОНОНЕНКО Анна Володимирівна,
Національний фармацевтичний університет
МОЗ України (м. Харків),
асистент кафедри фармакології

Офіційні опоненти: доктор фармацевтичних наук, професор
МАРЧИШИН Світлана Михайлівна,
ДВНЗ «Тернопільський державний медичний
університет ім. І. Я. Горбачевського» МОЗ України,
завідувач кафедри фармакогнозії з медичною
ботанікою

доктор фармацевтичних наук, професор
СЕМЕНІВ Дмитро Васильович,
ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний
університет» МОЗ України, завідувач кафедри
організації та економіки фармації і технології ліків

Захист відбудеться «26» жовтня 2017 р. о 10.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.64.605.03 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4).

Автореферат розісланий «25» вересня 2017 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради,
д. фарм. наук, професор

Т. С. Сахарова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Згідно статистичних даних ВООЗ в світі реєструється стрімка тенденція до зростання захворювань гепатобіліарної системи (M. Sayiner et al., 2016; С. Н. Мехтиев и соавт., 2016). Серйозною проблемою медицини сьогодення є ураження печінки токсичного генезу, особливо лікарськими препаратами (N. P. Chalasani et al., 2014; M. E. McDonnell et al., 2014; С. М. Дроговоз та співавт., 2015). Використання понад 4000 ксенобіотиків спричинює пошкодження печінки, при цьому частка лікарських засобів становить 20-40% всіх випадків розвитку гострої печінкової недостатності (С. М. Дроговоз та співавт., 2015). Внаслідок вживання лікарських препаратів 2-5% пацієнтів госпіталізують з приводу жовтяниці, а близько у 10% – розвивається гострий гепатит (E. Yoon et al., 2016). Окреме місце серед гострих уражень печінки посідає гострий гепатит, спричинений передозуванням пара-ацетамінофену (парацетамолу) (M. E. McDonnell et al., 2014; E. Yoon et al., 2016). У США щорічно фіксують майже 2 тис. випадків гострої печінкової недостатності, при цьому у 39% випадків спричинені прийомом парацетамолу. Це обумовлено частим застосуванням та доступністю парацетамолу, оскільки препарат у більшості країн світу належить до ОТС-групи препаратів (I. A. Зупанець та співавт., 2016). В Україні випадки гострого отруєння парацетамолом із супутнім ураженням печінки становлять 4% всіх гострих інтоксикацій (B. M. Пырочкин и соавт., 2015). У експериментальній фармакології дуже часто парацетамол використовують, в якості фармакологічного патогену для моделювання лікарського ураження печінки з метою вивчення оригінальних та генеричних лікарських засобів на предмет виявлення гепатопротекторної активності (O. B. Стефанов, 2001; A. H. Миронов и соавт., 2012).

Лікування токсичних гепатитів передбачає, першочергово, усунення впливу токсину, проведення дезінтоксикаційної терапії та призначення препаратів для відновлення порушених функцій печінки, зокрема гепатопротекторів (H. B. Харченко, 2015). На сучасному фармацевтичному ринку України гепатопротектори представлені широким асортиментом, проте через недостатність даних доказової медицини щодо ефективності цих препаратів, їх застосування обмежується (С. Н. Мехтиев та співавт., 2016). Одним із можливих шляхів підвищення терапевтичної ефективності є застосування гепатопротекторів з врахуванням циркадіанних та сезонних хроноритмів хворого. Перспективність хронофармакологічного підходу з метою підвищення ефективності лікування, комплаєнтності пацієнтів, безпеки та фармакоекономічної доцільності фармакотерапії безсумнівна (С. И. Рапопорт и соавт., 2012; С. М. Дроговоз и соавт., 2016; H. D. Бунятян и соавт., 2017).

Зважаючи на наведене, дана дисертаційна робота присвячена вивченню циркадіанної залежності фармакологічної активності гепатопротекторних препаратів, які зареєстровані в Україні та широко застосовуються в практичній гепатології, а саме, препарату силімарину «Карсил», препарату синтетичного походження «Антраль[®]» та препарату амінокислот «Глутаргін».

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертація виконана за планом науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету, затверджених МОЗ України «Фармакологічні дослідження біологічно активних речовин і лікарських засобів синтетичного та природного походження, їх застосування в медичній практиці» (№ держреєстрації 0103U000478), «Фармакологічне вивчення біологічно активних речовин та лікарських засобів» (№ держреєстрації 0114U000956), в яких автор є співвиконавцем.

Мета і завдання дослідження. *Мета роботи:* експериментальне обґрунтування доцільності визначення циркадіанних особливостей прояву фармакологічної активності гепатопротекторів для підвищення ефективності фармакотерапії захворювань гепатобіліарної системи.

Для досягнення зазначеної мети, поставлені такі *завдання:*

1. Встановити циркадіанну активність печінки щурів за фізіологічних умов оцінюючи вплив даного органу на динаміку показників вуглеводного, білкового, пуринового обмінів, регуляції прооксидантно-антиоксидантного балансу, екскреторних і детоксикаційних процесів.

2. Визначити особливості десинхронозів циркадіанних ритмів основних показників, що характеризують функціональний стан печінки за умов гострого хронодетермінованого токсичного гепатиту, модельованого введенням парацетамолу, у самиць та самців щурів, та оцінити гендерні особливості гепатотоксичної дії парацетамолу.

3. Оцінити циркадіанні особливості реалізації гепатопротекторної активності лікарського препарату «Антраль» за умов гострого хронодетермінованого парацетамолового гепатиту.

4. Оцінити циркадіанні особливості реалізації гепатопротекторної активності лікарського препарату «Карсил» за умов гострого хронодетермінованого парацетамолового гепатиту.

5. Оцінити циркадіанні особливості реалізації гепатопротекторної активності лікарського препарату «Глутаргін» за умов гострого хронодетермінованого парацетамолового гепатиту.

6. За отриманими результатами дослідження провести порівняльний аналіз циркадіанної залежності виразності фармакологічної активності обраних гепатопротекторів.

Об'єкт дослідження – хронотерапія уражень печінки.

Предмет дослідження – циркадіанна залежність виразності фармакологічної активності гепатопротекторів.

Методи дослідження. При виконанні дисертаційної роботи використовували комплексний підхід із залученням фармакологічних, біохімічних, імуноферментних і статистичних методів дослідження.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше експериментально доведена циркадіанна залежність виразності фармакологічної активності гепатопротекторів синтетичного та рослинного походження на моделі гострого токсичного гепатиту, спричиненого парацетамолом.

Розширено уявлення щодо циркадіанних особливостей функції печінки в

регулюванні динаміки добового рівня та активності прооксидантно-антиоксидантного балансу, обміну білків, вуглеводів, перебігу екскреторних та детоксикаційних процесів та встановлений циркадіанний пік активності печінки, який реєструється в денний період (15.00). Це підтверджується акрофазами вмісту відновленого глутатіону (ВГ), холестеролу, загального білірубіну та активності ферментів каталази і лужної фосфатази (ЛФ) та свідчить про підвищену активність детоксикаційних процесів в цей період.

Дістало подальший розвиток уявлення щодо циркадіанної залежності токсичності парацетамолу у самиць та самців щурів. Максимальні явища десинхронозу у самиць щурів за умов гострого парацетамолового гепатиту реєструвалися ввечері (21.00), що підтверджується активацією процесів цитолізу (зростання активності АлАТ та АсАТ в 3,4 разу, $p < 0,05$) порушеннями зі сторони системи антиоксидантного захисту (зменшення вмісту ВГ на 20%), обмінних процесів (зниження вмісту глікогену на 33%, $p < 0,05$ і зростання концентрації сечової кислоти на 69%, $p < 0,05$) та розвитком синдрому холестазу (зростання концентрації загального білірубіну на 24% в порівнянні з тваринами інтактного контролю). Мінімальну деструктивну дію парацетамол чинив вдень (15.00), що обумовлено встановленим циркадіанним піком активності печінки в цей період. Встановлено відсутність гендерних особливостей реалізації гепатотоксичної дії парацетамолу.

Отримані нові дані щодо циркадіанних особливостей фармакологічної дії окремих гепатопротекторних препаратів природного та синтетичного походження зареєстрованих в Україні. Встановлено, що синтетичний гепатопротектор «Антраль» найвираженіше проявляє фармакологічний ефект у ранковий (09.00) та вечірній (21.00) періоди, що підтверджується нормалізацією прооксидантно-антиоксидантного дисбалансу: зростання активності СОД в 1,2 разу ($p < 0,05$), збільшення концентрації ВГ в 1,3 та 1,4 разу ($p > 0,05$), відповідно. У ці ж періоди спостерігалось найвираженіше інгібування цитодеструктивних змін (зниження активності трансміаз в 1,3-1,5 рази ($p < 0,05$), відновлення енергетичних та обмінних процесів (зростання вмісту глікогену в 1,3-1,5 рази, $p < 0,05$; тенденція до нормалізації вмісту сечовини та сечової кислоти) зменшення проявів холестазу (зниження активності ЛФ та вмісту загального білірубіну в 1,1-1,2 разу) в порівнянні з такими в групах тварин контрольної патології у ці періоди. Хронопрофіль досліджуваного рослинного гепатопротектору «Карсил» подібний антралю, однак, за виразністю впливу на окремі показники карсил поступався антралю. Циркадіанний максимум гепатопротекції глутаргіну спостерігався у денний (15.00) та нічний (03.00) періоди, що підтверджується пригніченням цитодеструктивних процесів (зменшення активності трансміаз в 1,2-1,3 разу, $p < 0,05$) та відновленням обмінних процесів (тенденція до нормалізації вмісту ВГ (32%), глікогену (18%) та сечовини 1,2 разу, $p < 0,05$), відносно щурів контрольної патології.

Порівняльний аналіз циркадіанної залежності гепатопротекторної активності досліджуваних препаратів дозволив зробити висновок відносно подібності хронопрофілей антралю та карсилу з піком гепатопротекції ранком та ввечері, що зумовлено наявністю вираженої прямої антиоксидантної дії у цих препаратів. У хронопрофілі препарату «Глутаргін» пік припадає на денний та нічний періоди, що

пов'язанно з його метаболітропним механізмом гепатопротекції.

Практичне значення отриманих результатів. Встановлені циркадіанні хронопрофілі фармакологічної активності досліджуваних гепатопротекторів, виступають підставою для вдосконалення методів фармакотерапії захворювань печінки.

За матеріалами дисертаційної роботи запропоновано спосіб моделювання гострого хронодетермінованого парацетамолового гепатиту та оптимізацію режиму прийому пара-ацетамінофену з врахуванням біоритмів печінки (інформаційний лист МОЗ України №276-2015, 2015 р). Запропоновано новий удосконалений спосіб терапії гепатитів з врахуванням хроноособливостей антралю (патент на корисну модель №106394 від 25. 04. 2016 р.).

Результати дисертаційної роботи впроваджено в науково-педагогічний процес кафедри фармакології з клінічною фармакологією ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України» (протокол № 05 від 12.01.2017 р.), кафедр фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова (протокол № 07 від 11.01.2017 р.), Буковинського державного медичного університету (протокол № 18 від 17.05.2017 р.) та Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця (протокол № 33 від 12.06.2017 р.) та у науково-дослідний процес відділу загальної токсикології Київського інституту фармакології та токсикології НАМН України (протокол № 03 від 15.05.2017 р.).

Особистий внесок здобувача. Дисертація є завершеною науковою роботою. Разом з науковим керівником визначено мету, завдання, розроблено методичні підходи, згідно з якими відібрана модель гепатиту та методи для виконання експериментальної частини дисертаційної роботи. Дисертантом особисто проведено патентно-інформаційний пошук, аналіз даних літератури за темою дисертаційної роботи, експериментальні дослідження, проведена їх статистична обробка. Разом з керівником та співвиконавцями дисертант брала участь в аналізі експерименту, узагальненні отриманих даних та написанні статей. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий доробок.

Визначення вмісту кортикостерону сироватки крові проведено на базі Харківського національного медичного університету за консультативної допомоги доцента кафедри біохімії Т. В. Горбач.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи викладено та обговорено на XIII Міжрегіональній науковій конференції «Актуальні питання біології та медицини» (м. Старобільськ, 2015 р.); II Міжнародній науково-практичній internet-конференції «Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин» (м. Харків, 2016 р.); I науково-практичній інтернет-конференції «Фармацевтична наука та практика: проблеми, досягнення, перспективи розвитку» (м. Харків, 2016 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Медична наука та практика в умовах сучасних трансформаційних процесів» (м. Львів, 2016 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Ключові питання наукових досліджень у сфері медицини у XXI століті» (м. Одеса, 2016 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації надруковано 16 робіт: 9 статей, з них – 7 у фахових виданнях, рекомендованих МОН України та 2 статі у наукових іноземних виданнях; 1 патент на корисну модель, 1 інформаційний лист МОЗ України, 5 тез доповідей.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, п'яти розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел літератури та додатків. Загальний обсяг дисертації складає 195 сторінок друкованого тексту. Робота ілюстрована 60 таблицями та 8 рисунками. Список використаних джерел містить 207 найменувань, з них 120 кирилицею та 87 латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Хронофармакологічне дослідження проведено у весняний сезон 2015 року, на 224 рандомбредних щурах (160 самиць та 64 самців) масою 190-210 г. Тварини перебували у віварії ЦНДЛ НФаУ, що атестована МОЗ України (посвідчення № 058/15 від 08.12. 2015 р., чинне до 07.12. 2019 р.).

Робота з тваринами проводилася відповідно до вимог GLP, рекомендацій ДЕЦ МОЗ України (О. В. Стефанов, 2001), Національними «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах (Україна, 2001), Законом України №3447-IV від 21.02.2006 р. зі змінами «Про захист тварин від жорсткого поводження» та ухвалою першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2007). Дотримання етичних норм підтверджено комісією з біоетики НФаУ (протокол № 3 від 27.03.2017 р.).

Об'єктами хронофармакологічного вивчення обрано такі гепатопротектори: «Антраль» (таблетка вкрита оболонкою містить – 100 мг антранілату алюмінію) ПАТ «Фармак», Україна; «Карсил» (таблетка вкрита оболонкою містить – 22,5 мг флавоноїдів розторопші) АТ «Софарма», Болгарія; та «Глутаргін» (L-глутаміл, L-аргінін; 250 мг в 1 таблетці покритій оболонкою в перерахунку на аргінін) ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я»», Україна. Дослідження виконано в три етапи, які представлені на рис. 1.

Експериментальні дослідження першого етапу проведено в такі періоди доби: ранковий (09.00), денний (15.00), вечірній (21.00) та нічний (03.00). В усіх досліджуваних групах щурів активність АлАТ та АсАТ, вміст загального білка, сечовини, сечової кислоти, глюкози, загального білірубину у сироватці крові визначали за допомогою стандартних наборів НВП «Філісіт-Діагностика» (Україна); а активність ЛФ і вміст холестеролу за допомогою наборів ТОВ «СпайнЛаб» (Україна) та вміст кортикостерону за набором Corticosterone EIA Kit – Enabling Discovery in Life Sciences (Японія). У гомогенаті печінки визначали вміст ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) (И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили, 1977), відновленого глутатіону (ВГ) (С. С. Чернадчук и соавт., 2010), активність супероксиддисмутази (СОД) (Т. В. Сирота, 1999) та каталази (М. А. Королюк и соавт., 1988), а також вміст

глікогену (Н. П. Мешкова, 1979).

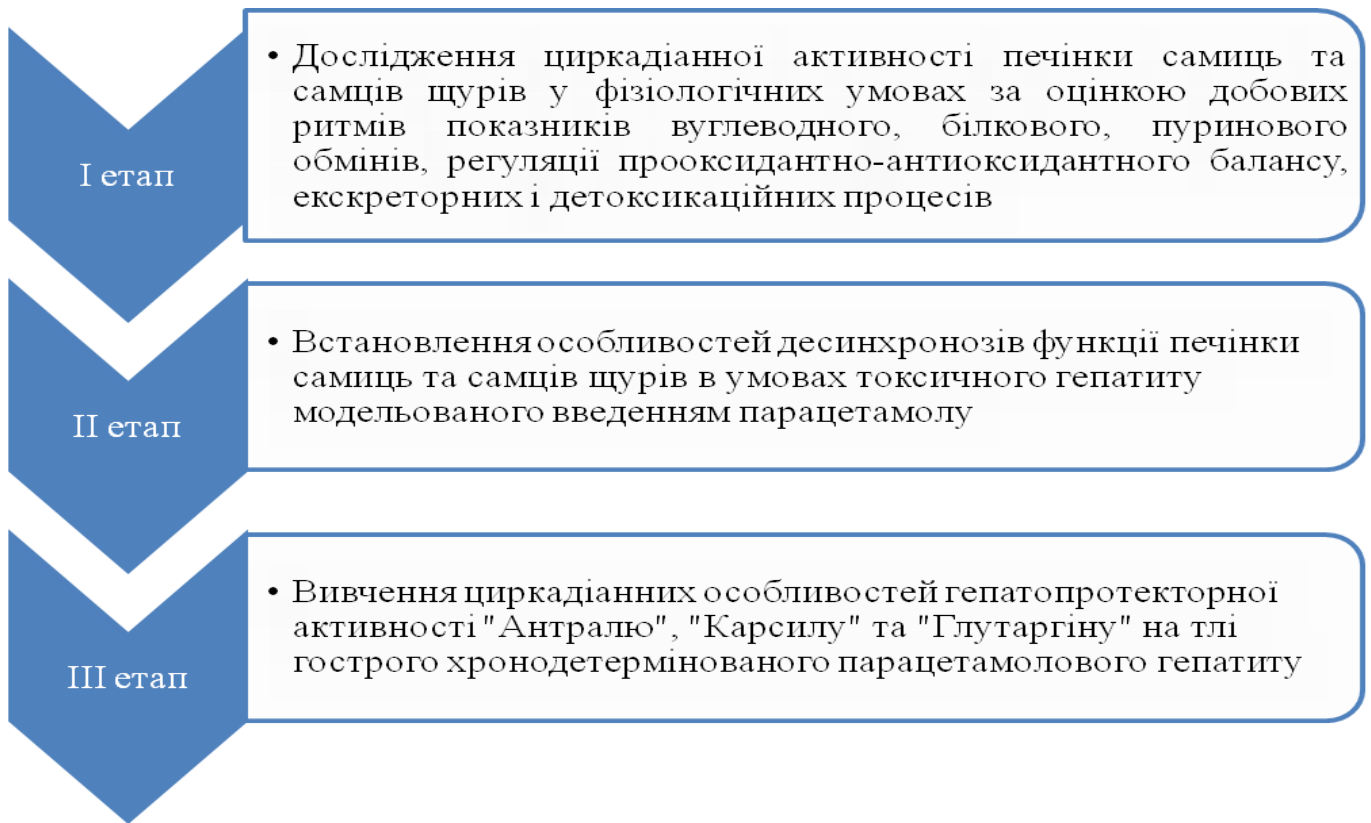


Рис. 1. Схема експериментального вивчення циркадіанної активності печінки щурів у фізіологічних умовах, на тлі моделювання токсичного гепатиту та при застосуванні гепатопротекторів

На другому етапі досліджень моделювали гострий гепатит шляхом введення парацетамолу (1000 мг/кг) у ранковий (09.00), денний (15.00), вечірній (21.00) та нічний (03.00) періоди доби (А. Н. Миронов и соавт., 2012). На наступному етапі проведена оцінка циркадіанної залежності гепатопротекторної активності досліджуваних препаратів за внутрішньошлункового їх введення у лікувально-профілактичному режимі, а саме за 1 год до застосування парацетамолу та 2 год після його введення. Досліджувані препарати вводили в наступних дозах: «Антраль» – 8 мг/кг (Т. С. Сахарова, 1989); «Карсил» – 100 мг/кг (А. Н. Миронов и соавт., 2012); «Глутаргін» – 135 мг/к (розрахунок дози для тварин за константою Ю. Р. Рыболовлева, 1979). У тварин груп контрольної патології та щурам, яким вводили досліджувані препарати, в сироватці крові та гомогенаті печінки визначали показники аналогічні, як і у інтактних тварин та які зазначено вище.

Аналіз експериментальних даних проводили використовуючи таку хронобіологічну номенклатуру: акрофаза (AF) – час доби, коли реєструється максимальне значення досліджуваного показника та батифаза (B) – мінімальне; мезор (M) – середнє значення досліджуваного показника протягом доби. Мезор визначали за допомогою програми Cosinor-Analysis 2.4 for Excel 2000/XP.

Статистичну обробку отриманих результатів проведено за програмою

«Statistica 8,0». Використовували непараметричний критерій Манна-Вітні та коефіцієнт кореляції Спірмена для з'ясування кореляційних взаємоз'язків (прийнятий рівень значущості $p < 0,05$) (С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, 2000).

Результати та їх обговорення. Аналіз результатів першого етапу досліджень дозволив встановити особливості циркадіанної динаміки прооксидантно-антиоксидантного балансу, показників обмінних, екскреторних та детоксикаційних процесів щурів, за фізіологічних умов, оцінюючи 15 показників, що віддзеркалюють стан та активність досліджуваних процесів та обмінів (табл. 1).

Таблиця 1

Циркадіанні особливості активності печінки здорових щурів

Показники	Стать тварин (n=8)	Період доби				Мезор	AF/B (рази)
		03.00	09.00	15.00	21.00		
1	2	3	4	5	6	7	8
ВГ, ум.од.	самиці	≠	≠	AF*	B	=	2,0
	самці	B	≠	AF*	≠		2,2
СОД, ум.од.	самиці**	≠	AF	≠	B	=	1,2
	самці**	≠	AF	≠	B		1,2
Каталаза, мккат/л	самиці	B	≠	AF*	≠	=	1,8
	самці	B	≠	AF*	≠		1,8
ТБК-АП, мкмоль/г	самиці	≠	B	≠	AF*	=	1,9
	самці	≠	B	≠	AF*		2,1
АЛАТ мкмоль/год*мл	самиці	≠	≠	AF*	B	=	1,4
	самці**	≠	≠	AF	B		1,1
АсАТ мкмоль/год*мл	самиці	≠	≠	AF*	B	=	1,9
	самці	≠	≠	AF*	B		1,5
Глюкоза, ммоль/л	самиці**	AF	B	≠	≠	↑1,3	1,2
	самці	AF*	B	≠	≠		1,6
Глікоген, мг/г	самиці	AF*	B	≠	≠	=	1,6
	самці	AF*	≠	≠	B		1,7
Кортикостерон, пкг/мл	самиці	AF*	≠	B	≠	=	2,7
	самці	AF*	B	≠	≠		2,5
Загальний білок, г/л	самиці**	AF	≠	B	≠	=	1,3
	самці	AF*	≠	B	≠		1,2
Сечовина, ммоль/л	самиці**	AF	≠	≠	≠	=	1,2
	самці**	AF	B	≠	≠		1,2
Сечова кислота, мкмоль/л	самиці**	≠	AF	B	≠	=	1,1
	самці**	B	≠	AF	≠		1,3
Холестерол, ммоль/л	самиці**	B	≠	AF	≠	=	1,2
	самці	B	≠	AF*	≠		1,3

Продовж. табл. 1

1	2	3	4	5	6	7	8
Загальний білірубін, мкмоль/л	самиці	В	≠	AF*	≠	=	2,0
	самці	В	≠	AF*	≠		1,6
ЛФ, Од/л	самиці	В	≠	AF*	≠	=	2,0
	самці**	В	≠	AF	≠		1,5

Примітки:

1. n – кількість тварин у групі;
2. AF – акрофаза досліджуваного показника;
3. В – батифаза досліджуваного показника;
4. ≠ – значення досліджуваного показника не досягало акрофази або батифази;
5. * – значення показника в акрофазу достовірно значуще, щодо батифази даного показника;
6. ** – значення показника в акрофазу не є достовірно значущим щодо його батифази;
7. = практична однаковість мезору у самиць та самців;
8. ↑ – у скільки разів мезор показника у самиць вищий такого у самців;
9. AF/В – в скільки разів значення досліджуваного показника в акрофазу вище батифази.

Зокрема, встановлено, що найвища активність антиоксидантної системи (АОС) спостерігається в ранково-денний, а мінімальна в вечірньо-нічний періоди, що підтверджується акрофазами та батифазами досліджуваних показників прооксидантно-антиоксидантного балансу (табл. 1). Акрофаза вмісту загального білка, що реєструвалася у вечірньо-нічний період, свідчить про вищу добову активність катаболічних процесів у цей період у порівнянні з анаболічними (батифаза загального білка) у ранково-денний (В. Ф. Учайкин и соавт., 2002). Достовірно значуща акрофаза вмісту ВГ, холестеролу, загального білірубіну та активності каталази і ЛФ, яка реєструвалася о 15.00, дає можливість спрогнозувати підвищену активність детоксикаційних процесів вдень, у порівнянні з іншими досліджуваними періодами доби (табл. 1). Також встановлено, що чітко виражений циркадіанний ритм (значення досліджуваного показника в акрофазу було достовірно значущим відносно його батифази) у щурів обох статей характерний для вмісту ВГ, ТБК-АП, глікогену, кортикостерону, загального білірубіну та активностей каталази і АсАТ (табл. 1). Не спостерігалось виразності циркадіанного ритму: активності СОД, вмісту сечовини та сечової кислоти у щурів обох статей, тоді як активність АлАТ, ЛФ характеризувалися виразною циркадіанністю у самиць, та відсутністю виразності добового ритму даних показників у самців. Крім того, тільки у самців, чіткий циркадіанний ритм був характерний для вмісту глюкози, загального білка та холестеролу (табл. 1). Також встановлено, що у самиць та самців акрофази синхронні за 14

досліджуваними показниками, батифази – за 10, а аналіз мезорів ритмів досліджуваних показників свідчить про їх однаковість (за винятком мезору глюкози) (табл. 1). Про подібність циркадіанних ритмів досліджуваних показників у самиць та самців щурів свідчить відношення AF/B, яке було однаковим або дуже близьким у тварин обох статей (табл. 1). Отже, циркадіанні ритми досліджуваних показників у самиць та самців були практично однаковими.

На другому етапі наших досліджень було виявлено особливості змін циркадіанних ритмів печінки за умов гострого парацетамолового гепатиту (десинхроноз). Аналіз отриманих результатів за 15 досліджуваними показниками (аналогічних інтактним тваринам) дозволив оцінити зміни функціональної активності печінки в умовах патології. Не зважаючи на те що, розвиток десинхронотичних змін протягом доби не однаковий та залежить від періоду доби в який моделювали гепатит, результати кореляційного аналізу між показниками, що віддзеркалюють стан системи антиоксидантного захисту (вміст ВГ) та цілісність структурних мембран (активність трансміназ), дозволили встановити певну закономірність, що спостерігалася у всі досліджувані періоди доби у щурів з гепатитом. Чим вищий вміст ВГ в гепатоцитах, тим менш виражена токсична дія парацетамолу та навпаки (коефіцієнт кореляції Спірмена $r = -0,43-0,94$) (табл. 2).

Таблиця 2

Кореляційна взаємозалежність вмісту відновленого глутатіону та активності маркерів цитолізу за умов гострого хронодетермінованого гепатиту

	Коефіцієнт Спірмена (самиці) (n=8)			Коефіцієнт Спірмена (самці) (n=8)		
	ВГ-АлАТ	ВГ-АсАТ	АлАТ-АсАТ	ВГ-АлАТ	ВГ-АсАТ	АлАТ-АсАТ
03.00	- 0,88*	- 0,77	+ 0,94*	- 0,71	- 0,60	+ 0,83*
09.00	- 0,60	- 0,77	+ 0,94*	- 0,83*	- 0,94*	+ 0,94*
15.00	- 0,66	- 0,49	+ 0,64	- 0,48	- 0,43	+ 0,94*
21.00	- 0,77	- 0,94*	+ 0,83	- 1,0	- 0,83*	+ 0,83*

Примітки:

- 1 n – кількість тварин у групі;
2. * – статистична достовірність існування кореляційного взаємозв'язку;
3. r – коефіцієнт кореляції Спірмена;

Вищевказане підтверджується наступним: мінімальні десинхронозні зміни при введенні парацетамолу у тварин обох статей спостерігалися в денний період (15.00): у самців реєструвалася лише тенденція до зростання активності АлАТ (в 1,4 разу) ($p > 0,05$) та достовірне збільшення активності АсАТ (в 1,5 рази – самиці та в 1,6 разу – самці) ($p < 0,05$) (табл. 3), це обумовлено акрофазою вмісту ВГ в гепатоцитах, що і підтверджується мінімальними (протягом доби) величинами коефіцієнта кореляції Спірмена $r = -0,43-0,66$. Тому спостерігалася не значне зменшення вмісту ВГ (в 1,3 разу) ($p > 0,05$) та нівелювання акрофази активності каталази та ЛФ зі зменшення їх величин у тварин обох статей (табл. 3).

**Десинхронизація функцій печінки щурів за умов гострого
хронодетермінованого парацетамолового гепатиту**

Показник	Стать тварин (n=8)	Період доби			
		03.00	09.00	15.00	21.00
1	2	3	4	5	6
ВГ, ум.од.	ІК/КП самиці	↓1,3	↓1,4	↓1,3	↓1,1
	ІК/КП самці	↓1,9	↓1,7	↓1,3	↓1,9
СОД, ум.од.	ІК/КП самиці	–	–	–	–
	ІК/КП самці	–	–	–	–
Каталаза, мккат/л	ІК/КП самиці	–	–	↓1,6*	–
	ІК/КП самці	–	–	↓1,8*	–
ТБК-АП, мкмоль/г	ІК/КП самиці	–	–	–	–
	ІК/КП самці	–	–	–	–
АЛАТ мкмоль/год*мл	ІК/КП самиці	↑1,7	↑2,5*	–	↑3,4*
	ІК/КП самці	↑2,7*	↑1,8	↑1,4	↑2,8*
АсАТ мкмоль/год*мл	ІК/КП самиці	↑2,5*	↑3,0*	↑1,5*	↑3,4*
	ІК/КП самці	↑3,1*	↑3,2*	↑1,6*	↑3,2*
Глюкоза, ммоль/л	ІК/КП самиці	–	–	–	–
	ІК/КП самці	–	–	–	–
Глікоген, мг/г	ІК/КП самиці	↓1,6*	↓1,8*	–	↓1,5*
	ІК/КП самці	↓2,1*	↓1,9*	–	↓1,3
Кортикостерон, пкг/мл	ІК/КП самиці	–	–	–	–
	ІК/КП самці	–	–	–	–
Загальний білок, г/л	ІК/КП самиці	↓1,1*	–	–	–
	ІК/КП самці	↓1,2*	–	–	↓1,1
Сечовина, ммоль/л	ІК/КП самиці	↓1,4*	–	↓1,2	↓1,3*
	ІК/КП самці	–	–	↓1,1	–
Сечова кислота, мкмоль/л	ІК/КП самиці	↑1,1	↑1,7*	–	↑1,7*
	ІК/КП самці	↑2,0*	↑1,3*	–	↑2,3*
Холестерол, ммоль/л	ІК/КП самиці	↑1,1	↑1,1	–	–
	ІК/КП самці	–	↑1,1	–	↑1,1
Загальний білірубін, мкмоль/л	ІК/КП самиці	↑1,4*	↑1,4*	–	↑1,2
	ІК/КП самці	↑1,3*	↑1,4*	–	↑1,4*
ЛФ, Од/л	ІК/КП самиці	↑1,4*	↑1,4*	↓1,3	↑1,3
	ІК/КП самці	↑1,7*	↑1,2	↓1,1	–

Примітки:

1. n – кількість тварин у групі;
2. * – значення показника на тлі патології достовірно значуще щодо інтактних щурів;
3. ↑(↓) – у скільки разів збільшувався (зменшувався) показник у тварин контрольної патології (КП) щодо інтактних (ІК);

4. – відсутність практично значущих змін досліджуваного показника відносно інтактного контролю чи контрольної патології.

У самиць найвираженіше процеси десинхронозу при введенні парацетамолу (за зростанням активності маркерів цитолізу) реєструвалися у вечірній (21.00) та нічний (03.00) періоди. Зокрема, ввечері (21.00) спостерігалось достовірно зростання активності АлАТ та АсАТ в 3,4 разу ($p < 0,05$). Також у цей період спостерігалася тенденція до зменшення вмісту ВГ (в 1,1 разу) ($p > 0,05$), глікогену (в 1,5 рази) ($p < 0,05$), сечовини (в 1,3 разу) ($p < 0,05$) і зростання рівня сечової кислоти (в 1,7 разу) ($p < 0,05$) (табл. 3). У нічні години (03.00) на тлі патології активність АлАТ зростала в 1,7 разу та активність АсАТ в 2,5 рази ($p < 0,05$) (табл. 3); спостерігалася тенденція до зменшення вмісту ВГ (в 1,3 разу) ($p > 0,05$), достовірно зниження рівня глікогену (в 1,6 разу) ($p < 0,05$), вмісту загального білка (в 1,1 разу) ($p < 0,05$), сечовини (в 1,4 разу) ($p < 0,05$), одночасно реєструвалося достовірно збільшення вмісту загального білірубіну (в 1,4 разу) ($p < 0,05$) і активності ЛФ (в 1,4 разу) ($p < 0,05$) (табл. 3).

У самців, аналогічно самицям, максимальні десинхронозні зміни під впливом парацетамолу теж прослідковувалися у вечірньо-нічний період: активність маркерів цитолізу достовірно зростала в 2,7-2,8 разу – активність АлАТ (вечірньо-нічний період) ($p < 0,05$) та активність АсАТ в 3,2 разу ($p < 0,05$) ввечері і в 3,2 разу ($p < 0,05$) вночі (табл. 3). У вечірній період (21.00) разом зі зростанням активності маркерів цитолізу спостерігалось зменшення вмісту ВГ (в 1,9 разу відносно інтактних щурів) ($p > 0,05$), рівня глікогену (в 1,3 разу) ($p > 0,05$), одночасно реєструвалося достовірно зростання вмісту сечової кислоти (в 2,3 разу) ($p < 0,05$) та загального білірубіну (в 1,4 разу) ($p < 0,05$) (табл. 2). У нічний період у самців на тлі патології зі зростанням активності АлАТ та АсАТ реєструвалася тенденція до зменшення вмісту ВГ (в 1,9 разу) ($p > 0,05$), достовірно зниження концентрації глікогену (в 2,1 разу) ($p < 0,05$) та вмісту загального білка (в 1,2 разу) ($p < 0,05$) і достовірно зростання вмісту сечової кислоти (в 2,0 рази) ($p < 0,05$), загального білірубіну (в 1,3 разу) ($p < 0,05$) та активності ЛФ (в 1,7 разу) ($p < 0,05$) (табл. 3).

Ймовірно, найбільш виразний прояв гепатоксичної дії парацетамолу протягом доби саме у вечірній (21.00) та нічний (03.00) період обумовлений найменшим вмістом ВГ в гепатоцитах у ці періоди, оскільки система глутатіона бере участь в метаболізмі даного ксенобіотика (С. Bunchorntavakul et al., 2013; С М. Дроговоз и соавт., 2015). Крім того, у вечірньо-нічний період, з настанням активного періоду життєдіяльності нічних тварин, до яких відносяться щури, навіть за фізіологічних умов спостерігається зростання активності ПОЛ через механізм активації симпато-адреналової системи; а ГКС (акрофаза вмісту кортикостерону у щурів обох статей в цей період) здатні знижувати фагоцитарну активність лімфоцитів і продукцію ними цитокінів (С. М. Spies, 2011).

Моделювання гепатиту у ранковий період (09.00) характеризувалося середньодобовими величинами зростання активності маркерів цитолізу у щурів обох статей, зокрема у самиць активність АлАТ та АсАТ зростала в 2,5 і 3,0 рази ($p < 0,05$), тоді як у самців в 1,8 разу зростала активність АлАТ та в 3,2 разу активність АсАТ ($p < 0,05$) відносно тварин інтактного контролю. В цей період у тварин контрольної

патології обох статей спостерігалася тенденція до зменшення рівня ВГ, зокрема в 1,4 разу ($p > 0,05$) у самиць та в 1,7 разу ($p > 0,05$) у самців. Також реєструвалося достовірне зменшення вмісту глікогену (самиці – в 1,8 та самці в 1,9 разу ($p < 0,05$), відповідно) і тенденція до збільшення вмісту холестеролу (табл. 3). Для цього періоду, на тлі патології характерно достовірне зростання вмісту загального білірубіну (в 1,4 разу ($p < 0,05$) у тварин обох статей), рівня сечової кислоти (в 1,7 разу – самиці ($p < 0,05$) і в 1,3 разу ($p < 0,05$) самці) та активності ЛФ, відносно аналогічних груп щурів інтактного контролю (табл. 3). Аналіз отриманих даних свідчить про відсутність суттєвих гендерних відмінностей в характері розвитку десинхронозу під дією парацетамолу, що вказує на те, що при подальших дослідженнях хронофармакологічної активності гепатопротекторів можна використовувати лише одну статтю тварин.

На третьому етапі проведено вивчення циркадіанної залежності вираженості гепатопротекторної активності досліджуваних препаратів («Антралю», «Карсилу» та «Глутаргін») за умов гострого хронодетермінованого парацетамолового гепатиту. Результати даного експериментального етапу показали, що застосування препарату синтетичного походження «Антралю» в лікувально-профілактичному режимі на тлі модельованого гепатиту характеризувалося диференційованим проявом вираженості гепатопротекторних властивостей препарату протягом доби (табл. 4).

Таблиця 4

Особливості хронопрофілів гепатопротекторної активності антралю, карсилу та глутаргін за умов гострого хронодетермінованого гепатиту (n=8)

Показники	Група тварин	Період доби			
		03.00	09.00	15.00	21.00
1	2	3	4	5	6
ВГ, ум.од.	КП	↓1,3	↓1,4	↓1,3	↓1,1
	Антраль	–	↑1,3	–	↑1,4
	Карсил	–	↑1,2	–	↑1,2
	Глутаргін	↑1,3	↑1,1	↑1,2	–
СОД, ум.од.	КП	–	–	–	–
	Антраль	–	↑1,2**	–	↑1,2**
	Карсил	–	–	–	↑1,1
	Глутаргін	–	–	–	–
ТБК-АП мкмоль/г	КП	–	–	–	–
	Антраль	↓1,2	–	–	↓1,2
	Карсил	↓1,1	–	–	–
	Глутаргін	↓1,1	–	–	↓1,1
АлАТ мкмоль/год*мл	КП	↑1,7	↑2,5*	–	↑3,4*
	Антраль	–	↓1,5**	–	↓1,4**
	Карсил	–	↓1,4	1,2	↓1,5**
	Глутаргін	↓1,4**	–	↓1,3**	–
АсАТ	КП	↑2,5*	↑3,0*	↑1,5*	↑3,4*
	Антраль	–	↓1,3**	–	↓1,4**

Продовж. табл. 4

1	2	3	4	5	6
АсАТ мкмоль/год*мл	Карсил	–	↓1,4**	–	↓1,2
	Глутаргін	↓1,4	–	↓1,2	–
Глікоген, мг/г	КП	↓1,7*	↓1,8*	–	↓1,5*
	Антраль	–	↑1,5**	–	↑1,3
	Карсил	–	↑1,2	–	↑1,2
	Глутаргін	↑1,2	↑1,1	–	–
Сечовина, ммоль/л	КП	↓1,4*	–	↓1,2	↓1,3*
	Антраль	–	–	↑1,2	↑1,3
	Карсил	–	–	↑1,2	–
	Глутаргін	↑1,1	↑1,1	↑1,4	↑1,3
Сечова кислота, мкмоль/л	КП	↑1,2	↑1,7*	–	↑1,7*
	Антраль	–	↓1,3	–	↓1,2
	Карсил	–	↓1,3	–	↓1,2
	Глутаргін	–	↓1,2	–	–
Холестерол, ммоль/л	КП	↑1,1	↑1,1	–	–
	Антраль	–	–	–	–
	Карсил	–	↓1,1	–	–
	Глутаргін	–	–	–	–
Загальний білірубін, мкмоль/л	КП	↑1,5*	↑1,5*	–	↑1,3
	Антраль	–	↓1,1	–	–
	Карсил	–	↓1,2	↓1,1	–
	Глутаргін	–	–	–	–
ЛФ, Од/л	КП	↑1,4*	↑1,4*	↓1,2	↑1,3
	Антраль	↓1,2	↓1,2	–	↓1,1
	Карсил	↓1,3	↓1,4	↓1,1	↓1,3
	Глутаргін	↓1,2	↓1,1	–	↓1,1

Примітки:

1.* – значення показника на тлі патології достовірно значуще щодо інтактних щурів;

2. ** – значення показника при застосуванні досліджуваного препарату достовірно значуще щодо щурів з гепатитом;

3. ↑ (↓) – в скільки раз збільшувався (зменшувався) показник у тварин контрольної патології (КП) щодо інтактних (ІК);

4. – відсутність практично значущих змін досліджуваного показника щодо інтактного контролю чи контрольної патології;

5. n – кількість тварин у групі.

Застосування препарату «Антралю» за умов ранкового (09.00) та вечірнього (21.00) моделювання гепатиту сприяло вираженій тенденції до зростання вмісту ВГ (в 1,3 та 1,4 разу) ($p > 0,05$) при відсутності практичних змін цього показника за аналогічних умов вдень та вночі. Також у ранковий (09.00) та вечірній (21.00) період при застосуванні «Антралю» реєструвалося достовірно зростання активності СОД

(в 1,2 разу) ($p < 0,05$) та тенденція до збільшення активності каталази ввечері ($p > 0,05$) (табл. 4). Позитивна регуляція прооксидантно-антиоксидантного дисбалансу «Антралем» у ранковий та вечірній періоди відобразилася достовірним зниженням активності маркерів цитолізу: АлАТ в 1,5 рази (ранок) ($p < 0,05$) та в 1,4 разу (вечір) ($p < 0,05$) і АсАТ в 1,3 ($p < 0,05$) та 1,4 разу ($p < 0,05$), за аналогічних умов. Збереження функціональної активності гепатоцитів, при прийомі «Антралю» у ранковий та вечірній період характеризувалося і достовірно вищим вмістом глікогену у цих групах препарату в 1,5 рази (ранок) ($p < 0,05$) та в 1,3 разу ($p < 0,05$) (вечір). Також в ці циркадіанні періоди (ранок та вечір) під впливом «Антралю» реєструвалася тенденція до зниження вмісту сечової кислоти та сечовини (у вечірній та нічній групі препарату в 1,2 та 1,3 разу, відповідно) (табл. 4). Застосування «Антралю» на тлі гострого хронодетермінованого парацетамолового гепатиту (ГХДПГ) не характеризувалося змінами вмісту глюкози, кортикостерону та холестеролу не залежно від досліджуваного періоду доби (табл. 4).

Резюмуючи результати проведеного аналізу циркадіанної залежності гепатопротекторної активності «Антралю», слід виділити ранковий (09.00) та вечірній (21.00) періоди, в які препарат проявляв найбільш виражений фармакологічний ефект, що підтверджується позитивною динамікою змін активності АлАТ, АсАТ, вмісту ВГ, глікогену, сечової кислоти, загального білірубіну та активності ЛФ.

Застосування препарату рослинного походження «Карсил» на тлі моделювання гепатиту у ранковий (09.00) та вечірній (21.00) періоди сприяло тенденційному зростанню вмісту ВГ в гепатоцитах (в 1,2 разу) ($p > 0,05$) за відсутності змін активності ферментативної складової АОЗ: активності СОД та каталази. При введенні «Карсилу» в умовах гепатиту модельованого ранком та ввечері спостерігалася зменшення активності маркерів цитолізу: АлАТ в 1,4 разу (ранок) ($p < 0,05$) та в 1,5 рази (вечір) ($p < 0,05$) і АсАТ в 1,4 рази ($p < 0,05$) та 1,2 разу ($p < 0,05$), відповідно. Нормалізація неферментативної ланки захисту клітин (вмісту ВГ) під дією «Карсилу» та прояв мембраностабілізаційних властивостей препаратом (зниження активності маркерів цитолізу) у ранковий та вечірній періоди відобразилося збереженням функціональної активності гепатоцитів, на що вказує тенденція до зростання вмісту глікогену – в 1,2 разу ($p > 0,05$) в обох циркадіанних періодах та зменшення концентрації сечової кислоти в 1,3 разу – ранок ($p > 0,05$) та в 1,2 разу – вечір ($p > 0,05$). При введенні «Карсилу» на тлі патології модельованої в день (15.00) спостерігалася тенденція до зростання вмісту сечовини (в 1,2 разу) ($p > 0,05$), що свідчить про покращання перебігу детоксикаційних процесів у цей період (Nouf Al-Rasheed et al., 2016). Ранком під впливом «Карсилу», також спостерігалася тенденція до зменшення вмісту загального білірубіну та холестеролу (табл. 4). Застосування «Карсилу» в умовах ГХДПГ не характеризувалося змінами активності каталази, вмісту кортикостерону не залежно від періоду доби в який вводили препарат та моделювали гепатит (табл. 4).

Введення препарату на основі амінокислот «Глутаргін» сприяло тенденційному зростанню вмісту ВГ (в 1,1-1,3 разу) ($p > 0,05$) в усіх досліджуваних групах препарату відносно щурів контрольної патології за винятком вечірнього

періоду (табл. 4). Тоді, як активність СОД та каталази при застосуванні «Глутаргіну» не характеризувалася суттєвими змінами у порівнянні зі щурами із гепатитом. Активність АлАТ при введенні «Глутаргіну» зменшувалася в 1,4 разу ($p < 0,05$) у нічний період та в 1,3 разу ($p < 0,05$) вдень, відносно інтактних щурів та активність АсАТ в 1,4 та 1,2 разу ($p > 0,05$) за аналогічних умов. Зростання вмісту глікогену при застосуванні «Глутаргіну» спостерігалось у нічний (в 1,2 разу) ($p > 0,05$) і у ранковий (в 1,1 разу) ($p > 0,05$) періоди. Тенденція до збільшення вмісту сечовини під дією препарату в 1,1-1,4 разу ($p > 0,05$) реєструвалася протягом всіх досліджуваних періодів, а вміст сечової кислоти зменшувався ранком (в 1,2 разу) ($p > 0,05$) (табл. 4). Прийом глутаргіну на тлі ГХДПГ не сприяв змінам вмісту глюкози, кортикостерону, загального білка, холестеролу та загального білірубину в усі періоди доби (табл. 4).

Отже, застосування препарату «Глутаргін» на тлі моделювання гострого токсичного гепатиту вдень (15.00) та вночі (03.00) характеризувалося найбільш суттєвою спроможністю препарату відновлювати порушенні показники діяльності печінки. В ці період прийом «Глутаргіну» зменшував активність АлАТ, АсАТ, вміст сечової кислоти (03.00) та сприяв зростанню вмісту глікогену (03.00).

Резюмуючи результати порівняльного хронофармакологічного дослідження гепатопротекторної активності препаратів «Антраль», «Карсил» та «Глутаргін», можна зробити висновки відносно циркадіанних особливостей фармакологічної дії цих препаратів. А саме, «Антраль» та «Карсил» найбільш виразно проявляють гепатопротекторну дію за умов застосування на тлі ранкового та вечірнього моделювання патології, тоді як «Глутаргін» з циркадіанною протифазністю вдень та вночі. Незважаючи на подібність хронопрофілей препаратів «Антраль» та «Карсил» з циркадіанним максимумом гепатопротекції вранці та ввечері, слід відмітити, що за окремими досліджуваними показниками рослинний гепатопротектор «Карсил» поступався синтетичному «Антралю» за меншою виразністю нормалізації порушених в умовах патології печінки процесів. Зокрема, за зниженням активності АсАТ (21.00) «Антраль» достовірно в 1,2 разу ($p < 0,05$) більш виразно зменшував активність цього ферменту в порівнянні з «Карсилом» (табл. 4). Аналогічна тенденція прослідковувалася з активністю АлАТ в групах о 09.00: в 1,2 разу ($p < 0,05$) виразніше «Антраль» знижував активність ферменту, ніж при застосуванні «Карсилу» (табл. 4). Ймовірно, вищезазначена достовірно значуща перевага «Антралю» по відношенню до «Карсилу» відобразилася в достовірно вищому вмісті глікогену: в 1,3 ($p < 0,05$) та 1,1 разу ($p < 0,05$) вранці та ввечері (табл. 4). Вищезазначене, обумовлено, спорідненим механізмом реалізації гепатопротекторної активності «Антралю» та «Карсилу» (Carmela Loguercio et al., 2011). Зокрема, для «Карсилу» як і «Антралю» провідна роль в забезпеченні гепатопротекторної дії відводиться реалізації антиоксидантного ефекту (Khaled Khazim et al., 2013; Peter F. Surai., 2015). Загальновідома антирадикальна активність складових карсилу (груп флавоноїдів), а в «Антралеві» антирадикальний ефект реалізується координаційною сполукою, що лежить в основі препарату (Т. С. Сахарова, 1989; Г. С. Григор'єва та співавт., 1998). Однак, у препараті «Антраль» гепатопротекторна активність здійснюється через багатовекторність оскільки, антирадикальний ефект препарату реалізується також його втручанням в процеси мікросомального окиснення, шляхом конкурентних

взаємодій з іоном феруму, що входить до складу сукцинатдегідрогеназної системи (В. М. Фролов та співавт., 2000). Інгібування ферментних систем окиснювального фосфорилування приводить до гальмування процесів ПОЛ. Із іншої сторони, процеси ПОЛ пригнічуються мефенамовою кислотою (М. А. Мохорт, 2012), тому що «Антраль» це алюмінію мефенамат. Інгібування ЦОГ також сприяє накопиченню арахідонової кислоти (мембраностабілізуюча дія) (А. В. Матвеев, 2013). Ймовірно, саме вищевказаний комплексний механізм гепатопротекції обумовлює перевагу фармакологічної активності «Антралю» відносно «Карсилу» за окремими показниками. Щодо хронопрофілю «Глутаргін», то у даного препарату піки гепатопротекції, обумовлені відмінним від вищевказаних препаратів механізмом реалізації фармакологічного ефекту. Встановлено, що глутамінова кислота, окрім антиоксидантної дії, здатна стимулювати утворення оксиду азоту. L -аргінін – субстрат для утворення цитруліну і оксиду азоту, які за певних умов та концентрації проявляють антиоксидантну дію (О. Я. Бабак, 2003).

Результати проведених досліджень підтверджують актуальність та доцільність подальших експериментальних та клінічних досліджень з метою розширення знань з хронофармакологічних та хронокінетичних властивостей препаратів, що дозволить оптимізувати фармакотерапію гепатобіліарних захворювань.

ВИСНОВКИ

Незважаючи на чималий асортимент зареєстрованих в Україні гепатопротекторних препаратів, проблема успішного лікування гепатитів різної етіології залишається невирішеною. Це обумовлено багатьма причинами, в тому числі через стандартний, не завжди оптимальний режим призначення цих препаратів. А саме, не враховується залежність ефективності гепатопротекторів від циркадіанних та сезонних хроноритмів хворого.

Дисертаційна робота присвячена вивченню актуального наукового завдання, яке полягає в оптимізації терапії гепатобіліарної системи шляхом врахування циркадіанних особливостей прояву фармакологічної активності досліджуваними гепатопротекторами. Отримані дані підтверджують актуальність та доцільність проведення подальших хронофармакологічних експериментальних та клінічних досліджень препаратів «Антраль», «Карсил» та «Глутаргін» з метою встановлення їх розгорнутого «хронопортрету».

1. За фізіологічних умов у щурів встановлений циркадіанний пік активності печінки, який реєструється в денний період (15.00), що підтверджується акрофазами вмісту відновленого глутатіону, холестеролу, загального білірубіну та активності каталази і ЛФ, що свідчить про підвищену активність детоксикаційних процесів в цей період.

2. Максимальні явища десинхронозу у самиць щурів за умов гострого парацетамолового гепатиту реєструвалися ввечері (21.00), що підтверджується активацією процесів цитолізу (зростання активності АлАТ та АсАТ в 3,4 разу; ($p < 0,05$)) порушеннями з боку антиоксидантного захисту (зменшення вмісту ВГ на 20%), обмінних процесів (зниження вмісту глікогену (на 33%) $p < 0,05$, і вмісту

сечової кислоти на 69%, $p < 0,05$) та синдромом холестазу (зростання концентрації загального білірубину на 24%, $p < 0,05$ та активності ЛФ в 1,3 разу) в порівнянні з тваринами інтактного контролю. В усі досліджувані періоди зростання активності маркерів цитолізу знаходиться у від'ємній кореляційній залежності від вмісту ВГ ($r = -0,43-0,94$). Мінімальну десинхроностичну дію парацетамол проявляв в денний (15.00) період, що обумовлено циркадіанним піком активності печінки у цей час.

3. При моделюванні токсичного гепатиту у самців щурів парацетамол проявляв аналогічний циркадіанний профіль гепатотоксичної дії, що і у самиць з піком токсичності ввечері (21.00) та мінімумом вдень (15.00). У самців, як у самиць в усі досліджувані періоди зростання активності трансміназ обернено пропорційно корелювало із вмістом ВГ ($r = -0,43-1,0$). Встановлена відсутність гендерних відмінностей гепатотоксичної дії парацетамолу у щурів виступає підставою для удосконалення методичних підходів до вибору статі щурів при доклінічних дослідженнях гепатопротекторів.

4. Найбільш виразний циркадіанний фармакологічний ефект синтетичного гепатопротектора «Антраль» встановлено за умов його застосування на тлі гострого парацетамолового гепатиту у ранковий (09.00) та вечірній (21.00) періоди, що підтверджується позитивною динамікою регулювання прооксидантно-антиоксидантного дисбалансу: зростання активності СОД в 1,2 разу ($p < 0,05$), збільшення концентрації ВГ в 1,3 та 1,4 разу ($p > 0,05$) відповідно. У ці ж періоди спостерігалось найвиразніше інгібування цитодеструктивних змін (зменшення активності маркерів цитолізу в 1,3-1,5 рази ($p < 0,05$), відновлення обмінних процесів (зростання вмісту глікогену в 1,3-1,5 рази, $p < 0,05$; тенденція до нормалізації вмісту сечовини та сечової кислоти) зменшення проявів холестазу (зниження активності ЛФ та вмісту загального білірубину в 1,1-1,2 разу) в порівнянні з такими в групах тварин контрольної патології у ці періоди.

5. Акрофаза гепатопротекторної активності рослинного препарату «Карсил» спостерігалася за умов його застосування на тлі гепатиту, модельованого у ранковий (09.00) та вечірній (21.00) періоди, про що свідчить пригнічення цитодеструктивних процесів (зменшення в 1,2-1,5 разу активності маркерів цитолізу ($p < 0,05$) та вплив на енергетичні і обмінні процеси (зростання вмісту глікогену (в 1,2 разу) та зменшення вмісту сечової кислоти (в 1,2 разу).

6. У хронопрофілі гепатопротекторної активності препарату амінокислотного складу «Глутаргін» за умов гострого парацетамолового гепатиту найвиразніша гепатопротекторна дія реєструвалася у денний (15.00) та нічний (03.00) періоди, про що свідчить інгібування цитодеструктивних процесів (зменшення активності трансміназ в 1,2-1,3 разу ($p < 0,05$) та відновлення обмінних (тенденція до нормалізації вмісту ВГ, глікогену та сечовини), відносно аналогічних показників щурів контрольної патології.

7. Порівняльний аналіз хронопортретів досліджуваних гепатопротекторів дозволив визначити найбільш виражену фармакологічну активність синтетичного гепатопротектора «Антраль» з піком активності у ранковий (09.00) та вечірній (21.00) періоди. Хроноособливості гепатопротекторної активності «Карсилу» подібні циркадіанним хроноритмам «Антралю». Проте карсил поступався антралю

(в 1,2 разу) за впливом на пригнічення цитолізу (зниження активності АлАТ (09.00) і АсАТ ($p < 0,05$) (21.00)) та нормалізацією обмінних процесів (більш суттєвіше зростання вмісту глікогену в 1,3 та 1,1 разу ($p < 0,05$) в ранковий та вечірній періоди). На відміну від антралю та карсилу для глутаргіну максимум гепатопротекторної активності реєструється у денний та нічний періоди, що обумовлено метаболітропним механізмом реалізації гепатопротекторного ефекту препарату.

8. Результати проведених досліджень підтверджують актуальність та доцільність подальших експериментальних та клінічних досліджень з метою розширення знань з хронофармакологічних та хронокінетичних властивостей препаратів, що дозволить оптимізувати фармакотерапію захворювань гепатобіліарної системи.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Особливості циркадіанної динаміки антиоксидантної системи та перекисного окислення ліпідів у щурів / К. О. Калько, С. М. Дроговоз, А. Ю. Позднякова, Н. В. Захарко. Клінічна фармація. 2015. № 4 С. 52-57 (*особистий внесок: проведення експерименту, участь в аналізі даних, написання статті*).

2. Особливості циркадіанної динаміки обмінних та жовчосекреторних процесів у щурів / К. О. Калько, С. М. Дроговоз, Т. К. Юдкевич, Н. В. Бездітко. Український біофармацевтичний журнал. 2016. № 2 (43). С. 45-49 (*особистий внесок: проведення експерименту, участь в аналізі даних, написання статті*).

3. Особливості циркадіанної динаміки вуглеводного обміну та активності маркерів цитолізу у щурів / К. О. Калько, О. Я. Міщенко, А. В. Кононенко, Т. В. Горбач, Т. К. Юдкевич, С. М. Дроговоз. Клінічна фармація. 2016. № 3. С. 49-53 (*особистий внесок: проведення експерименту, участь в аналізі даних, написання статті*).

4. 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 (*особистий внесок: проведення експерименту, участь в аналізі даних, написання статті*).

5. Десинхроноз белкового и пуринового обменов при парацетамоловом гепатите / Е. А. Калько, С. М. Дроговоз, Н. В. Захарко, Н. В. Бездетко. Весник фармации. 2016. № 1 (71). С. 91-95 (*особистий внесок: проведення експерименту, участь в аналізі даних, написання статті*).

6. Циркадианная зависимость токсичности парацетамола у крыс / Е. А. Калько, С. М. Дроговоз, А. Ю. Позднякова, Н. В. Захарко. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2016. Т. 79, № 7. С. 25-28 (*особистий внесок: проведення експерименту, участь в аналізі даних, написання статті*).

7. Особливості змін циркадіанних біоритмів вуглеводного обміну щурів в умовах гострого парацетамолового гепатиту / К. О. Калько, С. М. Дроговоз, А. В. Кононенко, Н. В. Захарко, Т. В. Горбач, О. Я. Міщенко, Н. В. Бездітко. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2016. № 3 (49) С. 48-53 (*особистий внесок: проведення експерименту, участь в аналізі даних, написання статті*).

8. Калько К. О., Дроговоз С. М., Пазюк Д.-М. В. Циркадіанна залежність впливу карсилу на активність маркерів цитолізу та вміст відновленого глутатіону за умов хронодетермінованого парацетамолового гепатиту. Журнал фармакології та лікарської токсикології. 2016. № 2. С. 49-53 (*особистий внесок: проведення експерименту, участь в аналізі даних, написання статті*).

9. Circadian characteristics of the glutargin influence on protein and purine metabolism under the condition of chronodetermined acetaminophen hepatitis in rats / K. O. Kalko, S. M. Drogovoz, S. Yu. Strigol, A. V. Kononenko, V. A. Ulanova, T. K. Yudkevich. Український біофармацевтичний журнал. 2016. № 4 (45). С. 71-74 (*особистий внесок: проведення експерименту, участь в аналізі даних, написання статті*).

10. Калько К. О., Дроговоз С. М., Захарко Н. В. Особливості десинхронізації біоритмів жовчосекреторних процесів щурів в умовах парацетамолового гепатиту. Актуальні питання біології та медицини: зб. наук. праць за матер. XIII Міжрегіональної наук. конф. м. Старобільськ, 17-18 грудня 2015 р., Старобільськ: Вид-во ДЗ «ЛНУ імені Тараса Шевченка», 2016. С. 61-63.

11. Калько К. О., Дроговоз С. М., Боряк Л. І. Вплив антралю на циркадіанні ритми прооксидатно-антиоксидантного гомеостазу на тлі хронодетермінованого парацетамолового гепатиту. Ключові питання наукових досліджень у сфері медицина: зб. наук. праць за мат. міжнародної наук. конф. м. Одеса, 15-16 квітня 2016 р., ГО.: Серія «Південна фундація медицина», 2016. С. 18-22.

12. Калько К. О., Дроговоз С. М., Юдкевич Т. К. Циркадіанна залежність впливу карсилу на вуглеводний обмін в умовах хронодетермінованого парацетамолового гепатиту. Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин: зб. наук. праць за мат. міжнародної наук. конф. internet-конф. м. Харків, 21-23 березня 2016 р., Х.: Серія «Наука», 2016. С. 121-123.

13. Калько К. О., Дроговоз С. М. Циркадіанна залежність впливу глутаргіну на вміст глюкози та глікогену в умовах хронодетермінованого парацетамолового гепатиту. Фармацевтична наука та практика: проблеми, досягнення, перспективи розвитку: зб. наук. праць за мат. I міжнародної наук. конф. інтернет-конференції м. Харків, 24-25 березня 2016 р., Х.: Серія «Наука», 2016. С. 267-269.

14. Калько К. О., Дроговоз С. М., Кононенко А. В. Циркадіанна залежність впливу глутаргіну на активність маркерів цитолізу в умовах хронодетермінованого парацетамолового гепатиту. Медична наука та практика в умовах сучасних трансформаційних процесів: зб. наук. праць за мат. міжнародної наук. конф. м. Львів, 22-23 квітня 2016 р., Львів, 2016. С. 85-88.

15. Калько К. О., Дроговоз С. М., Юдкевич Т. К. Спосіб хронодетермінованої терапії медикаментозних гепатитів: пат. 106394 України: МКП (2016.01) А61К 31/00, А61Р 1/16; заяв. 26.10.2015; опубл. 25.04.2016, Бюл. №8 -4 с. (*особистий внесок: проведення експериментальної частини дослідження, участь в аналізі даних, оформленні патенту*).

16. Дроговоз С. М., Калько К. О., Захарко Н. В. Оптимізація режиму прийому пара-ацетамінофенолу з врахуванням біоритмів печінки. Інформаційний лист про нововведення в схемі охорони здоров'я № 276-2015. Укрмедпатентінформ МОЗ України. К., 2015 р. 4 с. (*особистий внесок проведення експериментальної частини дослідження, участь в аналізі даних, оформленні інформаційного листа*).

АНОТАЦІЯ

Калько К.О. Хронофармакологічне дослідження активності гепатопротекторних засобів – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 14.03.05 – «Фармакологія» – Національний фармацевтичний університет МОЗ України, Харків, 2017 р.

Дисертація присвячена хронофармакологічному вивченню циркадіанних особливостей прояву гепатопротекторної активності таких препаратів: «Антраля», «Карсила» та «Глутаргіна». Дослідження проведено на моделі гострого парацетамолового гепатиту модельованого у хронодетермінованому режимі: у ранковий (09.00), денний (15.00), вечірній (21.00) та нічний (03.00) періоди доби. В результаті аналізу 15 досліджуваних показників функції печінки встановлено, що розвиток гепатиту у вечірній період характеризувався найбільш вираженою добовою токсичністю парацетамолу, мінімальною – вдень, за тими ж показниками. Антраль та карсил найбільш виражено проявляють гепатопротекторну активність на тлі ранкового та вечірнього моделювання патології, що зумовлено наявністю прямої антиоксидантної дії у цих препаратів, тоді як для глутаргіну пік гепатопротекції припадає на денний та нічний періоди, що пов'язано з метаболітропним механізмом гепатопротекції. Результати проведених досліджень підтверджують актуальність та доцільність подальших вивчень особливостей хронопортрету антралю, карсилу та глутаргіну з метою розширення знань з хронофармакологічних та хронокінетичних властивостей цих препаратів, що дозволить оптимізувати режим їх прийому задля удосконалення фармакотерапії захворювань гепатобіліарної системи. Крім того, встановлені особливості циркадіанної токсичності парацетамолу необхідно враховувати при подальших дослідженнях хронопортрету цього препарату з метою зниження його токсичності.

Ключові слова: гепатити токсичного генезу, печінка, гепатопротекторна активність, циркадіанні ритми.

АННОТАЦИЯ

Калько Е.А. Хронофармакологическое изучение активности гепатопротекторных средств – На правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени кандидата фармацевтических наук по специальности – 14.03.05 – «Фармакология» – Национальный фармацевтический университет МОЗ Украины, Харьков, 2017 г.

Диссертация посвящена экспериментальному хронофармакологическому изучению циркадианной активности гепатопротекторных средств: «Антраля», «Карсила» и «Глутаргина». Исследование проведено на модели острого парацетамолового гепатита моделированного у хронодетерминированом режиме: в утренний (09.00), дневной (15.00), вечерний (21.00) и ночной периоды. В результате анализа 15 исследуемых показателей функции печени, установлено, что развитие гепатита в вечерний период характеризовалось наиболее выраженной суточной активностью парацетамола, а минимальной днем. Антраль и карсил наиболее выражено, проявляют гепатопротекторную активность на фоне утреннего и ночного моделирования патологии, что обусловлено наличием прямого антиоксидантного

действия у этих препаратов, тогда как для глутаргина пик гепатопротекции приходится на дневной и ночной периоды, что связано метаболитропным механизмом гепатопротекции. Результаты проведенных исследований подтверждают актуальность и рациональность дальнейшего изучения особенностей хронопортретов антраля, карсила и глутаргина с целью расширения знаний с хронофармакологических и хронокинетических свойств этих препаратов, что позволит оптимизировать режим их приема для совершенствования фармакотерапии заболеваний гепатобилиарной системы. Кроме того, установленные особенности циркаданной токсичности парацетамола следует учитывать при дальнейших исследованиях хронопортрета этого препарата с целью снижения его токсичности.

Ключевые слова: гепатиты токсического генеза, печень, гепатопротекторная активность, циркадианные ритмы.

ANNOTATION

Kalko K.O. Chronopharmacological study of the activity of hepatoprotective medicines – Manuscript.

The thesis for a candidate of pharmaceutical science degree in speciality 14.03.05 – «Pharmacology». – National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine. – Kharkiv, 2017

The thesis deals with the study of chronopharmacological activity of circadian rhythms dependence of such medicines with hepatoprotective effect as «Anthral», «Karsil» and «Glutargin». For this purpose, the state of biorhythms of the liver of healthy rats was firstly established, then, the peculiarities of pathological changes of circadian rhythms in the conditions of acute hepatitis were analyzed. And directly, in the third stage, an assessment of hepatoprotector medicines effect on the correction of desynchronization in pathology were carried out. The results of the third stage made it possible to compare the chronoprofiles of the investigational drugs among themselves.

At the first stage of research, the rats were decapitated with a biomaterial fence at the following periods and hours of the day: morning (9 a.m.), day (3 p.m.), evening (9 p.m.) and night (3 a.m.). The evaluation of the daily activity of the liver was carried out by analyzing the dynamics of 15 indicators of carbohydrate, protein, and purine metabolism, regulation of prooxidant-antioxidant homeostasis, excretory and detoxification processes. In the blood serum activity of AlAT, AsAT, LPh, the content of total protein, albumin, uric acid, urea, cholesterol, total bilirubin, glucose, corticosterone were determined. In the liver homogenate glycogen content, RG, TBA-reactans and the activity of SOD and catalase were diagnosed. The results of the first stage of the research allowed us to establish that a clearly expressed circadian rhythm (the meaning of the investigated indicator in acrophase was significant in relation to its bathephase) in the rats of both sexes was characterized for the content of RG, TBA-reactans, glycogen, corticosterone, total bilirubin, catalase and AsAT activity. There was no pronounced circadian rhythm in SOD activity, urea and uric acid content in both sexes, when the activity of AlAT, LPh and albumin content was characterized by expressive circadian rhythm in females, and the lack of expressiveness of the daily rhythm of these indexes in males.

The second stage of the thesis is devoted to the study of the desynchronous

changes peculiarities in circadian rhythms of the investigated processes and exchanges in the conditions of acute paracetamol hepatitis. The model of acute paracetamol hepatitis was reproduced by single administration of paracetamol (1000 mg per kg) in chronodetermined mode in four periods of the day: morning (9 a.m.), day (3 p.m.), evening (9 p.m.) and night (3 a.m.). It was established that among all the studied periods of the day, hepatitis modeling was characterized by the most expressive paracetamol toxicity in the evening. Minimal desynchronous changes in rats of both sexes were observed during hepatitis modeling during the day.

Hepatoprotectors under the research were administered in the treatment-prophylactic regimen, in particular, in 1 hour before and 2 hours after paracetamol administration. The introduction of anthral in the background of morning and evening hepatitis modeling contributed to the normalization of the pro-oxidant-antioxidant balance in hepatocytes, which was reflected by the preservation of their integrity, and confirmed by a lower level of cytolysis markers activity relative to that in animals of control pathology, such as AlAT was decreased in 1.5 times (in the morning) and in 1.4 times (in the evening) and AsAT was decreased in 1.3 and 1.4 times, under similar conditions. Also, in these circadian groups, there was a significantly higher content of glycogen (in 1.5 times in the morning and in 1.3 times in the evening) and a positive dynamics in the normalization of urea and total bilirubin levels.

The use of karsil against the background of acute paracetamol hepatitis modeled at different periods of the day was similar to anthral circadian chronoprophylus implementation of the hepatoprotective effect of this medicine. In the conditions of simulated morning and evening acute paracetamol hepatitis, the introduction of karsil contributed to a decrease in the activity of cytolysis markers, such as AlAT was decreased in 1.4 times and 1.5 times, and AsAT was decreased in 1.4 and 1.2 times. The normalization of the non-enzymatic cell protection layer (RG content) under the effect of karsil and the manifestation of the membrane-stabilizing properties of the medicine (the above described reduction in the activity of cytolysis markers) in the morning and evening periods of a day was reflected in the conservation of energy supply of hepatocytes: there was a tendency to increase the content of glycogen in the use of karsil (in 1.2 in both groups) and maintaining the functional activity of hepatocytes (uric acid content decreased in 1.3 times in the morning and in 1.2 times in the evening).

According to a summary analysis of markers that were changing in the administration of glutargin, it was found that the maximum manifestation of hepatoprotective effect of this medicine was recorded during day and night. The activity of markers of cytolysis when taking glutargin decreased, in particular, AlAT was decreased in 1.4 times at night and in 1.3 times in the daytime and AsAT was decreased in 1.4 and in 1.2 times under similar conditions. Normalization of glycogen level under the action of glutargin was recorded against the background of the night modeling of hepatitis. There was tendency in urea increase under the activity of the drug in 1.1-1.4 times in all circadian drug groups.

Key words: hepatitis of toxic origin, liver, hepatoprotective activity, circadian rhythms.

Підписано до друку 22.09.17 р.
Формат 60×84^{1/16}. Папір офсетний. Гарнітура Times New Roman.
Друк ксерографічний. Ум. друк. арк. 0,9.
Наклад 100 прим. Зам. №09-17

Надруковано ТОВ «Видавництво «Форт»
Свідоцтво про внесення до Державного реєстру видавців
ДК №333 від 09.02.2001 р.
61023, м. Харків, а/с 10325. Тел. (057)714-09-08