

АКТИВНОСТЬ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В МИКРОСОМАХ ПЕЧЕНИ КРЫС С ТОКСИЧЕСКИМ ПОРАЖЕНИЕМ АЦЕТАМИНОФЕНОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА

Погорецкая Х.В., Клищ И.Н.

ГВУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет имени И.Я. Горбачевского МОЗ Украины», Тернополь, Украина (46001, г. Тернополь, майдан Воли, 1), e-mail: klishch@yandex.ru

Проведено исследование возрастных особенностей влияния ацетаминофена на активность окислительных процессов в микросомах печени. Токсическое поражение животным 3-х возрастных периодов – 3-месячных, 6-8-месячных и 18-24-месячных вызывали внутривентральным введением субстанции ацетаминофена в дозе 1250 мг/кг (0,5 LD₅₀) на протяжении 2-х суток. Установлено, что ацетаминофен проявляет наиболее выраженное ингибирующее влияние на окислительные процессы в микросомах печени молодых животных, что, вероятно, является следствием высокой активности в них электронтранспортных цепей, участвующих в метаболической активации ацетаминофена. Медленная нормализация показателей у старых животных может быть следствием преобладания у них ковалентного связывания с цитохромом P-450, что приводит к необратимому его ингибированию, а также снижением белоксинтетических процессов вследствие токсического влияния на хромосомный аппарат гепатоцитов.

Ключевые слова: парацетамол, микросомальное окисление, возрастные периоды, печень.

ACTIVITY OF OXIDATIVE PROCESSES IN LIVER MICROSOMES OF RATS WITH TOXIC DAMAGE BY ACETAMINOPHEN ACCORDING TO AGE

Pogoretskaya K.V., Klishch I.N.

I.Ya. Horbachevskiy Ternopil State Medical University, Ternopol, Ukraine (46001, Maidan Voli, 1), e-mail: klishch@yandex.ru

The age-effects of acetaminophen on the activity of oxidative processes in liver microsomes were studied. Toxic damage to animals of 3 age periods - 3-month's, 6-8-month's and 18-24-month's was caused by intraperitoneal injection of acetaminophen substance in dose of 1250 mg / kg (0,5 LD₅₀) during 2 days. It was determined that acetaminophen shows the most evident inhibitory effect on the oxidative processes in liver microsomes of young animals, which is probably due to the high activity of the electron transport chains involved in the metabolic activation of acetaminophen. Slow normalization of indices in old animals may be a consequence of the prevalence of their covalent binding to cytochrome P -450, which leads to its irreversible inhibition and reduction of protein-synthetic processes due to the toxic effects on the chromosomes of hepatocytes.

Keywords: paracetamol, microsomal oxidation, age periods, liver.

Введение

Важной проблемой современной медицины являются патологические состояния, возникающие в результате отрицательного влияния лекарств. Как пример лекарственного препарата, который при передозировке проявляет выраженное токсическое действие, можно привести парацетамол (ацетаминофен, N-ацетил-пара-аминофенол), являющийся активным метаболитом фенацетина с химически близкими к нему свойствами [9; 10]. На фармацевтическом рынке Украины в данное время наблюдается увеличение ассортимента препаратов парацетамола (более 50 названий) как отечественного, так и зарубежного производства, характеризующихся разнообразием лекарственных форм – от таблеток и суппозиторий до фруктовых детских сиропов, что делает его удобным для применения для пациентов всех возрастных групп. Популярность парацетамола значительно возрастает, и это

связано с распространенным мнением о том, что он является наиболее безопасным из всех так называемых малых анальгетиков [2]. В терапевтических дозах парацетамол имеет относительно небольшую токсичность, однако сознательное, а зачастую неконтролируемое употребление высоких доз препарата может привести к возникновению тяжелых осложнений. По данным медицинских центров США и Великобритании, передозировка ацетаминофена является главной причиной острой печеночной недостаточности [9; 11]. Поражение печени парацетамолом часто принимает форму фульминантной печеночной недостаточности и нередко заканчивается смертью больных [9]. Токсические эффекты ацетаминофена тесно ассоциированы с особенностями его биотрансформации с участием ферментов эндоплазматического ретикулаума печени – в частности, с образованием высокоактивного интермедиата N-ацетил-пара-бензохинонимина, супероксидного радикала [10; 14], а также способностью ацетаминофена и его токсичного метаболита стимулировать клетки Купфера, являющиеся продуцентами оксида азота, чрезмерные количества которого проявляют мощное повреждающее действие

Гепатотоксичность ацетаминофена в значительной степени зависит от возраста. В частности, новорожденные и молодые крысы могут проявлять как относительную устойчивость к некрозогенному влиянию препарата вследствие низкой активности цитохрома P-450, так и повышенную чувствительность из-за недостаточных ресурсов глутатиона [8]. Для детей и взрослых терапевтические интервалы и токсический потенциал ацетаминофена также разные [2].

Целью нашей работы было исследование влияния ацетаминофена на процессы микросомального окисления у крыс разных возрастных периодов.

Материал и методы исследования

Опыты проведены на 102 половозрелых крысах-самцах трех возрастных периодов: неполовозрелые (молодые) – в возрасте 3 месяца, половозрелые (взрослые, 6-8-месячные) и старые – 18-24-месячные, содержащихся на стандартном рационе вивария ГБУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет имени И.Я. Горбачевского». Животные были разделены на 2 группы: 1-я группа – интактные животные, которым вводили растворитель (2%-ный раствор крахмала); 2-я группа – животные с острым поражением ацетаминофеном, который вводили внутривентрикулярно в дозе 1250 мг / кг (0,5 LD₅₀) в виде суспензии в 2%-ном растворе крахмального геля 1 раз в сутки в течение 2 суток. Использовали субстанцию ацетаминофена производства Huzhou Weigang Enterprises Group Corp. Эвтаназию животных производили методом декапитации в условиях тиопентал-натриевого наркоза на первые, третьи и пятые сутки от последнего введения ацетаминофена. Все манипуляции с экспериментальными животными проводили в соответствии с

«Правилами выполнения работ с использованием экспериментальных животных» [3; 6]. В полученных методом дифференциального центрифугирования микросомах гепатоцитов [7; 12] определяли концентрацию цитохромов P-450 и b5 [1] на сектрофотометре Lambda 25 UV (Pelkin-Elmer, США), а также N-деметилазную активность по количеству образованного формальдегида в реакции деметилирования диметиланилина (DMA) и пара-гидроксилазную активность по количеству образованного пара-аминофенола [4]. По эффекту бокового положения определяли также длительность гексеналового сна – интегрального показателя, характеризующего детоксикационную способность микросом печени.

Полученный в результате экспериментов цифровой материал обрабатывали с помощью методов вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента [5]. Разницу между исследуемыми группами считали достоверной при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Как видно из данных, приведенных в табл. 1, существует достоверная разница показателей функционирования окислительных систем микросом печени здоровых крыс в зависимости от возраста. Концентрация цитохрома P-450 и активность окислительных процессов у интактных животных разных возрастных периодов отличаются. Так, у 3-месячных животных содержание металлопротеинов достоверно превышало аналогичный показатель взрослых и старых соответственно в 2,2 и 2,4 раза, а цитохрома b5 – в 1,5 и 2,2 раза. Более высокой у животных данной возрастной категории была также скорость N-деметилирования диметиланилина и гидроксилирования анилина. Эти данные свидетельствуют о значительных возрастных особенностях функционирования детоксикационной системы микросом печени. Старые животные характеризуются низкой функциональной активностью печеночных микросомальных монооксигеназ.

Введение ацетаминофена вызывало выраженное угнетение окислительной способности микросомальных ферментов в гепатоцитах животных всех возрастных периодов, однако наблюдались значительные возрастные различия. Наиболее выраженные в процентном отношении изменения через 24 ч после введения ацетаминофена наблюдались у 3-месячных животных. Так, концентрация цитохрома P450 снизилась у них на 45,8%, b5 - на 46,6%, N - деметилазная и пара-гидроксилазная активность соответственно на 40,5 и 33,7%, что достоверно отличается от показателей интактных животных. Менее выраженные отклонения наблюдались у взрослых крыс. Концентрация цитохрома P-450 у них снизилась до 59,4% , b5 - до 63,8%. Меньшим изменениям подвергались и процессы окисления. N-деметилазная активность снизилась до 68,6%, п-гидроксилазная – до 74,6%. В старых животных изменения были наименее выражены. Концентрация цитохрома P-450 в них составляла 65,1% , а b5 – 67,1% по сравнению со здоровыми, активность деметилирования DMA – 68,9%, а

гидроксилирования анилина – 75,8%. На третьи сутки после введения ацетаминофена в микросомах печени молодых животных показатели были почти на уровне первых суток, за исключением р-гидроксилазной активности, которая выросла и составила 82,6% от интактных. У взрослых животных наблюдался рост исследуемых показателей. Это особенно касается скорости окисления субстратов: N-деметиلاзная активность возросла до 90,9%, а п-гидроксилазная - до 86,6%. У животных 18-24-месячного возраста нами зафиксировано лишь незначительное повышение активности микросомальных ферментов по сравнению с первыми сутками. До 5-х суток картина несколько изменилась. У взрослых животных исследуемые нами показатели значительно улучшались и приближались к уровню интактных, в меньшей степени восстанавливались показатели молодых, а наименьшую тенденцию к нормализации проявляли ферменты микросом старых животных.

Таблица 1

Показатели ферментной активности микросом печени крыс разного возраста, пораженных ацетаминифеном ($M \pm m$)

Группа животных	Возраст	Показатель											
		Цитохром Р-450, ммоль/кг			Цитохром b ₅ , ммоль/кг			N-деметилазная активность, ммоль/кг·мин			Пара-гидроксилазная активность, ммоль/кг·мин		
Интактные	Молодые, n=10	1,53±0,13*			0,86±0,14*			12,57±0,78*			0,92±0,04*		
	Взрослые, n=10	0,69±0,06			0,58±0,08			8,15±0,24			0,75±0,02		
	Старые, n=10	0,63±0,05			0,49±0,04			7,64±0,22			0,69±0,02		
Ацетаминифен		24 ч	3-и сутки	5-е сутки	24 ч	3-и сутки	5-е сутки	24 ч	3-и сутки	5-е сутки	24 год	3-и сутки	5-е сутки
	Молодые, n=8	0,83±0,04**	0,85±0,07**	1,11±0,05**	0,46±0,07**	0,49±0,04**	0,59±0,05**	7,48±0,13**	8,39±0,23**	9,04±0,15**	0,61±0,02*	0,76±0,03**	0,80±0,05
	Взрослые, n=8	0,41±0,05**	0,46±0,06**	0,60±0,04	0,37±0,02**	0,39±0,02**	0,48±0,04	5,59±0,22**	7,41±0,15**	7,54±0,19	0,56±0,01**	0,65±0,04**	0,69±0,05
	Старые, n=8	0,41±0,04**	0,43±0,03**	0,49±0,03**	0,28±0,03**	0,29±0,03**	0,32±0,04**	5,26±0,41**	5,65±0,17**	5,83±0,15**	0,52±0,02**	0,56±0,03**	0,58±0,02**

Примечания здесь и в таблице 2:

* – разница достоверна по сравнению с взрослыми для интактных животных;

** - разница пораженных ацетаминифеном достоверна по сравнению с интактными животными соответствующих возрастных периодов

С целью интегральной оценки окислительной способности микросомальных монооксигеназ мы исследовали продолжительность гексеналового сна. Из результатов, представленных в табл. 2, видно, что с возрастом этот показатель значительно возрастает, и у взрослых и старых животных он достоверно выше, чем у молодых. Введение ацетаминофена наиболее интенсивно повышает продолжительность гексеналового сна у молодых животных. На 1-е сутки она превышала показатель интактных животных в 2,1 раза, на 3-и и 5-е соответственно в 1,9 и 1,6 раза. Продолжительность сна у взрослых и старых животных через 24 часа от момента введения ацетаминофена возросли на 56%, однако в дальнейшем показатель половозрелых животных снижался и составил соответственно 149,1 и 104,2%, тогда как у старых крыс снижение было менее выражено (соответственно 155,3 и 126,6% от уровня здоровых).

Таблица 2

Длительность гексеналового сна у животных разных возрастных периодов с токсическим поражением ацетаминофеном ($M \pm m$)

Возрастной период	Группа животных			
	Интактные, n=10	Пораженные ацетаминофеном		
		24 часа, n=8	3-и сутки, n=8	5-е сутки, n=8
Молодые	18,9±0,5*	38,6±1,2**	36,4±1,4**	30,4±2,2**
Взрослые	28,7±1,4	44,9±1,8**	42,8±1,6**	29,9±1,3
Старые	31,6±1,5	49,4±1,2**	49,1±1,7**	39,7±1,2**

Выводы

Таким образом, ацетаминофен проявляет наиболее выраженное ингибирующее влияние на окислительные процессы в микросомах печени молодых животных, что, вероятно, является следствием высокой активности в них электронтранспортных цепей, участвующих в метаболической активации ацетаминофена. Медленная нормализация показателей у старых животных может быть следствием преобладания у них ковалентного связывания с цитохромом P-450, что приводит к необратимому его ингибированию, а также снижением белоксинтетических процессов вследствие токсического влияния на хромосомный аппарат гепатоцитов.

Список литературы

1. Арчаков А.И. Микросомальное окисление. - М., 1975. - 327 с.
2. Викторов А.П. Этот «новый-старый парацетамол» // Современные проблемы токсикологии. – 1998. - № 2. – С. 87-91.

3. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) / за редакцією О.В. Стефанова. – К. : Авіцена. – 2001. – С. 115-128.
4. Карузина И.И., Арчаков А.И. Выделение микросомальной фракции печени и характеристика ее окислительных систем // Современные методы в биохимии. – М. : Медицина, 1977. – С. 49-62.
5. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – К. : Морион, 2000. – 320 с.
6. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / [Кожем'якін Ю.М., Хромов О.С., Філоненко М.А., Сайфетдінова Г.А.]. – К. : Авіцена, 2002. – 156 с.
7. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований. – Л. : Изд-во Ленинград. ун-та, 1982. – 272 с.
8. Трахтенберг І.М. Нариси вікової токсикології / за ред. І.М. Трахтенберга. – К. : Авіцена, 2005. – 256 с.
9. Cohen S.D. 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. Lieber C.S. Cytochrome P-450E1: its physiological and pathological role // Physiological reviews. – 1997. – V. 77, N 2. – P. 518-544.
11. Paracetamol toxicity: epidemiology, prevention and costs to the health-care system / C.L. Sheen, J.F. Dillon, D.N. Bateman, K.J. Simpson, T.M. Macdonald // Q.J. Med. – 2002. - V. 95, N 9: 609-619.
12. Shenkman J.B., Cinti D.L. Preparation of mikrosomes with calcium // Methods of enzymology. – 1974. – 52,partc. – P. 83-89.
13. Testa B. Mechanism of inhibition of xenobiotic-metabolising enzymes // Xenobiotic. – 1990. – Vol. 20, N 11. – P. 1129-1137.
14. Thomsen M.S. Oxidative metabolism of acetaminophen (paracetamol) to a reactive species: Involved cytochrome P-450 enzymes and target toxicity related to covalent binding // Ugeskr. Laeger. – 1996. – V. 158, N 28. – P. 4095-4096.

Рецензенты:

Корда М.М., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой медицинской биохимии ГБУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет им. И.Я. Горбачевского», г. Тернополь.

Посохова Е.А., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой фармакологии с клинической фармакологией ГБУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет им. И.Я. Горбачевского», г. Тернополь.