

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

*На правах рукопису*

**ПОВОЛОЦЬКА ВАЛЕРІЯ АРКАДІВНА**

**ФАРМАКОЛОГІЧНА КОРЕКЦІЯ ТОКСИЧНИХ ЕФЕКТІВ  
ПАРАЦЕТАМОЛУ**

14.03.08 - фармакологія

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Одеса - 1997



AB 37.085

Дисертація є рукопис

Роботу виконано в лабораторії загальної фармакології  
Державного наукового центру лікарських засобів (м. Харків).

**Науковий керівник:** кандидат медичних наук, старший науковий співробітник  
Чайка Леонід Олександрович

**Науковий консультант:** доктор біологічних наук, старший науковий співробітник  
Петренко Олександр Юрійович

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор  
Мардашко Олексій Олексійович  
  
доктор біологічних наук, старший науковий співробітник  
Зіньковський Володимир Георгійович

**Провідна установа:** Українська фармацевтична академія (м. Харків).

Захист відбудеться: "25" 03 1997 р. о "13<sup>00</sup>" год. на засіданні Спеціалізованої вченої ради Д 05.04.02 при Одеському державному медичному університеті (270100, м. Одеса, пров. Валіховський, 2).

Автореферат розіслано "18" 02 1997 р.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Одеського медичного університету.

Вчений секретар Спеціалізованої ради, доктор медичних наук, професор

Л.С. Годлевський

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**АКТУАЛЬНІСТЬ ПРОБЛЕМИ.** Лікарські препарати групи ненаркотичних анальгетиків-антипіретиків (НАА) відносяться до числа препаратів масового попиту. Однак, за останні 10-15 років, через небажані побічні ефекти їх номенклатура скоротилася практично до 2-3 найменувань (парацетамолу, пропіфеназону та анальгін), з яких пропіфеназон так і не знайшов застосування в Україні і в країнах СНД, анальгін поступово виходить з вітчизняного та зарубіжного ринків. В цій ситуації парацетамол за асортиментом препаратів та обсягом продаж зайняв провідне місце в номенклатурі НАА, будучи рекомендований ВООЗ у "Переліку основних лікарських засобів".

Однак, численні експериментальні та клінічні дані свідчать про небезпечність цього популярного препарату (Венгеровський А.І. та інш., 1991; Holme J.A. et al., 1986). У зв'язку з цим в Німеччині, Швейцарії, Великобританії, Бельгії, Росії та інш. країнах вводяться обмеження, спрямовані на зниження його максимальних доз і тривалості прийому (Соболева М.В. та інш., 1995).

Аналіз номенклатури препаратів з парацетамолом показує, що більша їх частка представлена комбінаціями з лікарськими засобами, які доповнюють або посилюють фармакологічну дію, але, в своїй більшості, практично не впливають на його токсикодинаміку.

Стан, що стався, диктує необхідність пошуку патогенетично обґрунтованих способів фармакологічної корекції токсичних ефектів парацетамолу з метою створення нових більш ефективних і безпечних комбінованих препаратів. Рішення відповідних фармакологічних задач є найбільш успішним на підставі поглибленого вивчення механізмів токсикодинаміки парацетамолу і впливу на її ключові ланки перспективних лікарських детоксикантів.

**МЕТА ТА ЗАДАЧІ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Метою даної роботи є дослідження патогенетично обґрунтованих шляхів фармакологічної корекції

токсикодинаміки парацетамолу.

**Для досягнення поставленої мети вирішувались такі задачі:**

1. Дослідити системні та клітинні токсичні ефекти парацетамолу і встановити діапазони його субтоксичних/токсичних доз та концентрацій на рівні цілісного організму та в системах *in vitro*.

3. Дослідити маловивчені аспекти проявлення токсичності парацетамолу, зокрема, вплив на низько- та високомолекулярні SH-залежні системи, структурно-функціональний стан мембран, мінеральний гомеостаз та процеси кровоутворення.

4. Вивчити вплив лікарських речовин з різними механізмами дії (прямих антиоксидантів, донорів SH-груп, активаторів метаболічних процесів, інгібіторів ейкозаноїдів) на ключові ланки токсикодинаміки парацетамолу.

5. Вивчити вплив потенційних детоксикантів парацетамолу, а також ацетилсаліцилової кислоти, расповсюдженої у комбінаціях з парацетамолом, на його фармакологічну активність.

#### **НАУКОВА НОВИЗНА ДОСЛІДЖЕННЯ**

1. Проведено теоретичне та експериментальне обґрунтування раціональних шляхів фармакологічної корекції токсичних ефектів парацетамолу, які повинні бути спрямовані на підвищення глутатіонового статусу організму, пригнічення ПОЛ, активацію систем антиокислювального захисту.

2. Досліджені маловивчені аспекти токсичності парацетамолу, зокрема: • вплив на пул низькомолекулярних SH-сполук печінки, як одного з основних факторів детоксикації; • вплив на функціонування SH-залежних ферментних систем; • вплив на біологічні мембрани; • вплив на мінеральний гомеостаз в системі "печінка/кров"; • вплив на кістково-мозкове кровоутворення.

3. Вперше досліджено вплив потенційних детоксикантів парацетамолу - аскорбінової кислоти, метіоніну, лізину байкалінату, кальцію

пантотенату, ацетилцистеїну - на ключові ланки його токсикодинаміки. Виявлені особливості механізмів їх детоксикуючої дії, зокрема: щодо аскорбінової кислоти, поряд з відомими антиокислювальними властивостями, встановлено її позитивний вплив на ферменти мітохондріального дихання; лізину байкалінату - на  $Ca^{2+}$ -гомеостаз в системі "печінка/кров" та еритропоез кісткового мозоку; ацетилцистеїну - стимулювання роботи SH-залежних ферментних систем, поряд з захистом систем низькомолекулярної SH-детоксикації.

4. Встановлено потенціюючий вплив ацетилцистеїну, метіоніну та лізину байкалінату на протизапальну активність парацетамолу.

#### ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ РОБОТИ

1. Експериментально обґрунтовані ходи до розробки нових оригінальних комбінованих засобів з парацетамолом, які відрізняються від його монопрепаратів більш високою безпечністю та ефективністю.

2. Розроблені і впроваджені у медичну практику комбіновані препарати з парацетамолом у формі таблеток - Аскопар, Цитропак, Копацил (Протоколи №3 від 31.03.94 р., №3 від 31.03.94 р., №3 від 30.09.93 р. Фармакологічного Комітету МОЗ України).

**АПРОБАЦІЯ РОБОТИ.** Матеріали дисертаційної роботи були представлені: на респ. науково-практ. конференції "Перспективи створення та виробництва лікарських засобів в Україні" (Одеса, 1993); конференції, присвяченій 100-річчю з дня народж. акад. О.І.Черкеса (Київ, 1994); на I Нац. з'їзді фармакологів України (Полтава, 1995); науково-практ. конференції "Наукові досягнення та проблеми виробництва лікарських засобів" (Харків, 1995); на II та III Російських нац. конгресах "Человек и лекарство" (Москва, 1995, 1996).

**ПУБЛІКАЦІЇ.** За темою дисертації видано 10 наукових робіт, з них - 3 наукові статті, 7 - тези доповідей на наукових конференціях, конгресах та з'їздах.

**ЗВ'ЯЗОК ЗАВДАНЬ ДОСЛІДЖЕННЯ З ПРОБЛЕМНИМИ ПРОГРАМАМИ.** Дослідження виконані в межах плану науково-дослідних робіт Державного наукового центру лікарських засобів (№№ держ. реєстрації тем 0193U041084, 0195U020262).

**ОСОБИСТИЙ ВНЕСОК ДИСЕРТАНТА В ОТРИМАНИХ НАУКОВИХ РЕЗУЛЬТАТАХ.** Автором обгрунтована схема біохімічних механізмів розвитку токсичних ефектів парацетамолу, визначені методологічні підходи, у відповідності з якими проведені експериментальні дослідження; здійснені аналіз та систематизація експериментальних матеріалів. Розроблені основні положення та висновки роботи.

#### **ОСНОВНІ ПОЛОЖЕННЯ, ЩО ВІНОСЯТЬСЯ НА ЗАХИСТ**

1. Токсичні ефекти парацетамолу обумовлені утворенням в процесі його біотрансформації саме при передозуванні метаболитів, що призводять до зниження пулу низькомолекулярних SH-детоксикантів печінки, порушення роботи SH-залежних ферментних систем (мітохондріального дихання, окислювального фосфорилування та інш.), активації перекисних та вільнорадикальних процесів, мінерального дисбалансу в системі "печінка/кров", порушення кістково-мозкового кровоутворення.

2. Раціональним та патогенетично обгрунтованим шляхом фармакологічної корекції токсичності парацетамолу є поєднане його застосування з детоксируючими речовинами. В якості таких речовин при створенні нових комбінованих препаратів можуть бути використані ацетилцистеїн, метіонін, аскорбінова кислота. Потенційно перспективними є лізину байкалінат та кальцію пантотенат.

**ОБСЯГ ТА СТРУКТУРА ДИСЕРТАЦІЇ.** Дисертацію викладено на 191 сторінках, з них 169 сторінок тексту, які включають вступ, огляд літератури, матеріали та зміст досліджень, 3 глави експериментальних досліджень, заключення та висновки. Ілюстрацій - 23, таблиць - 23, додатків - 3. Бібліографія - 219 найменувань, з них 153 - іноземні.

## **ЗМІСТ ДИСЕРТАЦІЙНОЇ РОБОТИ**

**НАПРЯМКИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.** Аналіз та систематизація існуючих даних свідчать, що токсичні ефекти парацетамолу при гострому або хронічному передозуванні зумовлені зміною його біотрансформації у бік утворення високореактивних метаболітів, зокрема, N-ацетилпарабензохіноніміну, а також семихіноїдного похідного, які в умовах дефіциту відновленого глутатіону, утворюють ковалентні зв'язки з білками, що призводить до дисфункції, а потім некрозу тканини печінки (Skoutakis V.A., 1982; Gutterid I.M.C., Warle N., 1981; Nelson S.D., 1991). Патогенетично обґрунтована терапія може бути спрямована на: • активацію процесів сульфатування/глюкуронування парацетамолу; • зниження інтенсивності мітросомального окислення; • підвищення рівня відновленого глутатіону; • послаблення ПОЛ; • активацію систем антиоксидантного захисту.

В даних дослідженнях як потенційні детоксиканти парацетамолу були обрані: аскорбінова кислота (**АК**) - прямий антиоксидант, що відновлює реактивні метаболіти в початковий парацетамол (Lake Brian G., Haggis R.A., 1981); метіонін (**Мт**) - амінокислота, яка після метаболічної трансформації може бути донором сірки, що бере участь в утворенні SH-груп цистеїну і стимулює процес сульфатування парацетамолу (Stom P., 1976); лізину байкалінат (**ЛБ**) - похідне тригідроксифлаво-ну шолонниці байкальської - інгібітор синтезу ейкозаноїдів (Гладченко С.В., 1993); кальцію пантотенат (**СаП**) - похідне пантотенової кислоти, попередника коензиму А - активатора метаболітів енергетичного та пла-стичного обміну, що порушуються при передозуванні парацетамолу; ацетилцистеїн (**АцЦ**) - прямий детоксикант парацетамолу, попередник синтезу глутатіону, проявляє антиокислювальні та гепатопротекторні властивості (Burgunder J. M., 1989, Гонський Я.І., 1995).

## ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктами досліджень стали парацетамол, АК, Мт, ЛБ, СаП, АцЦ, АСК (ацетилсаліцилова кислота), фенацетин, а також комбіновані препарати на основі парацетамолу та АСК - Аскопар, Цитропак, Копацил.

В роботі використані щури-самці масою 180-250 г та миші масою 18-25 г. Експерименти виконані в дослідях *in vivo* та *in vitro*. В залежності від виду та задач експериментів, ефекти вивчаємих препаратів *in vivo* досліджували при одно- та багатократному введенні в шлунок. При цьому оцінювали як вираженість та динаміку токсичних і фармакологічних ефектів, так і їх кількісні характеристики ( $LD_{50}$ ,  $ED_{50}$ ,  $IC_{50}$ ).

Системні та клітинні прояви токсикодинаміки парацетамолу оцінювали за загальнотоксичною дією (гостра токсичність, інтегральні біохімічні показники), а також за впливом на життєздатність і стан клітинних мембран в модельних системах гепатоцитів щурів та еритроцитів людини *in vitro*.

*In vivo* парацетамол вивчали в діапазоні доз від 5 до 1800 мг/кг. *In vitro* - в діапазоні концентрацій від 0,05 до 20 мМ. На початковому етапі досліджень було визначено режим дозування парацетамолу у щурів, необхідний для реалізації його токсичних ефектів: 300 мг/кг, внутрішньошлунково, щоденно, протягом 8 діб. Лікарські речовини, що досліджувалися як детоксиканти, вводили спільно з парацетамолом в середніх та вищих експериментальних терапевтичних дозах: АК - 75 та 150 мг/кг відповідно; Мт - 150 та 300 мг/кг; СаП - 90 та 180 мг/кг; ЛБ - 60 та 120 мг/кг; АцЦ - 60 та 120 мг/кг.

Критеріями оцінки загальнотоксичної дії були: активність аланін- та аспаратамінотрансфераз (АлАТ, АсАТ); лужної фосфатази; вміст сечовини, холестерину та білірубину.

Вплив парацетамолу на життєздатність клітин оцінювали за суправітальним забарвленням гепатоцитів щурів та їх морфологією, а також

по електроіндуційованій зміні об'єму клітин за Akesone S.I. (1986) на комп'ютерному електроцитаналізаторі.

Визначення низькомолекулярних SH-груп здійснювали в безбілкових фільтратах гомогенатів печінки щурів методом амперометричного титрування  $\text{AgNO}_3$  (Торчинський Ю.М., 1977). Клітинне дихання в різних метаболічних станах вивчали полярографічно (Петренко О.Ю., 1991). АТФ визначали люциферин-люциферазним методом (Бровко Л.Ю., 1983). Термодинамічну лабільність мембран - методом диференційної скануючої калориметрії (ДСК) з використанням термоаналітичної системи "Mettler TA 3000", Швейцарія (Джоунс М., 1982). Інтенсивність перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) - за рівнем МДА, а також спонтанної та  $\text{H}_2\text{O}_2$ -індуційованої хемілюмінесценції гомогенатів печінки щурів. Стан мінерального гомеостазу в системі "печінка/кров" оцінювали за вмістом іонів  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  та  $\text{Na}^+$  в гомогенатах печінки щурів (при їх повному озоленні) та в плазмі крові методом полум'яневої фотометрії. Стан кістково-мозкового кровоутворення вивчали в клітинній суспензії та мазках кісткового мозку стегнової кістки щурів (Каменецька Т.І., 1990). Гістологічне дослідження тканин печінки здійснювали при забарвленні її зрізів гематоксилін-еозином.

Анальгетичний, жарознижуючий та протизапальний ефекти оцінювали на загальновідомих моделях у щурів: "оцтово-кислі корчі", тест Рендал-Селітто; дріжджева пропасниця, плетизмометрія при карагеніновому набряку стопи (Дроговоз С.М. та співавт., 1994).

Статистичну обробку проводили за загальноприйнятими в фармакології методами з використанням пакету прикладних програм на IBM PC-486, оцінюючи імовірність на рівні значимості не менш 95% ( $P < 0,05$ ).  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{ED}_{50}$  та  $\text{LD}_{50}$  розраховували за Штабським Б.М. та співавт. (1980).

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### 1. Дослідження системних та клітинних токсичних ефектів парацетамолу

Парацетамол при однократному внутрішньошлунковому введенні мишам за рівнем гострої токсичності відноситься до класу "малотоксичних" речовин ( $LD_{50} = 1,07/0,65 \pm 1,50/$  г/кг), не відрізняючись від АСК ( $1,01/0,86 \pm 1,18/$  г/кг), фенацетину ( $1,21/0,74 \pm 1,68/$  г/кг), незначно - від напроксену ( $0,77/0,49 \pm 1,05/$  г/кг), будучи істотно менш токсичний від диклофенаку натрію ( $0,39/0,20 \pm 0,58/$  г/кг) та індометацину ( $0,036/0,027 \pm 0,045/$  г/кг).

Системні токсичні ефекти при однократному введенні парацетамолу щурам в діапазоні доз 100-900 мг/кг виявляються в дозозалежному зниженні індексу АсАТ/АлАТ, головним чином, за рахунок зростання активності АлАТ; при 900 мг/кг вірогідно зростає вміст білірубину в крові (табл.1).

Таблиця 1

Вплив парацетамолу при однократному і тривалому введенні на біохімічні показники в крові щурів

Групи	Доза, мг/кг	АлАТ, мккат/л	АсАТ, мккат/л	АсАТ/АлАТ	ЩФ, мМ/л	Холестерин, мМ/л	Білірубін, мкМ/л	Сечовина, мМ/л
Контроль, інтактний	--	0,48 $\pm 0,011$	0,57 $\pm 0,009$	1,19	16,0 $\pm 1,08$	4,94 $\pm 0,493$	7,5 $\pm 0,60$	3,60 $\pm 0,338$
Парацетамол однократно	100	0,64 $\pm 0,070$	0,68 $\pm 0,037^*$	1,06	15,5 $\pm 1,14$	4,64 $\pm 0,404$	7,3 $\pm 0,58$	3,81 $\pm 0,434$
	300	0,74 $\pm 0,035^*$	0,77 $\pm 0,056^*$	1,04	13,9 $\pm 1,78$	5,23 $\pm 0,406$	8,8 $\pm 0,38$	3,60 $\pm 0,307$
	900	1,1 $\pm 0,069^*$	0,79 $\pm 0,048^*$	0,72	18,6 $\pm 1,60$	5,19 $\pm 0,281$	12,9 $\pm 0,48^*$	4,85 $\pm 0,667$
Парацетамол тривало	100	0,65 $\pm 0,048^*$	0,63 $\pm 0,053$	0,97	15,5 $\pm 1,13$	5,23 $\pm 0,306$	10,8 $\pm 0,62$	4,74 $\pm 0,466$
	300	0,77 $\pm 0,044^*$	0,47 $\pm 0,041^*$	0,61	19,6 $\pm 1,17$	7,91 $\pm 0,560^*$	15,5 $\pm 0,95^*$	5,57 $\pm 0,796^*$

Примітки: кількість тварин в кожній групі - 6;

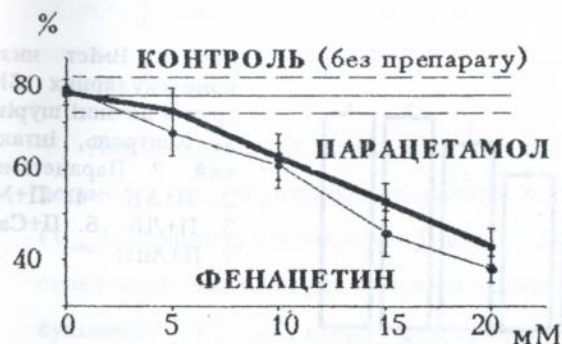
\* $P < 0,05$  порівняно з контролем.

Тривале (8-добове) введення парацетамолу супроводжується більш вираженим зростанням активності АлАТ, яке проявляється вже при 100

мг/кг. При 300 мг/кг вірогідно знижується активність АсАТ, зростає вміст холестерину, білірубину та сечовини в крові з тенденцією до зростання активності лужної фосфатази. Виявлені ефекти можна ідентифікувати як "гострий гепатит", який при відносно тривалому впливі парацетамолу супроводжується також холестатичними змінами і порушенням азотвидільної функції нирок.

Таким чином, *in vivo* токсичними при однократному введенні є дози порядку 900 мг/кг, при тривалому -  $\geq 300$  мг/кг. Очевидно, що в реалізації токсичних ефектів вирішальне значення має не стільки висока разова доза парацетамолу, скільки тривалість його введення, навіть при істотно меншому рівні доз.

В модельній системі ізольованих гепатоцитів щурів цитотоксичні ефекти парацетамолу проявляються в концентраційнозалежному зниженні їх життєздатності (мал. 1) з характерними морфофункціональними змінами: порушенням форми клітин, появою променеподібних випинань, крист, внутрішньоклітинних везикул. Подібні ж пошкодження викликає фенацетин (метаболічний попередник парацетамолу). При цьому парацетамол проявляє дещо меншу цитотоксичність, ніж фенацетин:  $IC_{50}$  - 16,4 та 13,9 мМ відповідно.



Мал.1. Вплив парацетамолу та фенацетину на динаміку життєздатності гепатоцитів щурів *in vitro*.

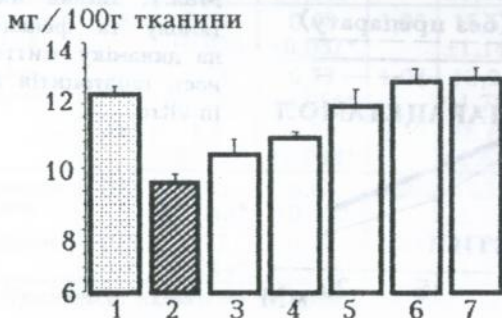
Електроіндуційоване збільшення об'єму еритроцитів людини ( $\Delta V$ ) при зростанні I від 200 до 450 мкА складає 106,8%. При інкубації їх з

парацетамолом в концентраціях від 0,05 до 10 мМ,  $\Delta V$  зростає від 114,0 до 129,3%, що може бути наслідком безпосередньої взаємодії амфифільних молекул препарату з бішаром плазматичної мембрани. При концентраціях 10-20 мМ спостерігається зниження приросту об'єму (109,2- 91,5%), яке, очевидно, свідчить про порушення структури і цілісності мембран. Встановлені діапазони токсичних концентрацій парацетамолу для еритроцитів корелюють з клінічними даними про його рівні в крові при гострій інтоксикації (Randall С., 1981).

*In vitro* в модельних системах гепатоцитів щурів та еритроцитів людини нетоксичними є концентрації парацетамолу до 1 мМ, субтоксичними - 1-10 мМ, токсичними - 10-20 мМ.

## 2. Дослідження механізмів токсикодинаміки парацетамолу та її фармакологічної корекції за допомогою потенційних детоксикантів

Тривале (8 діб) внутрішньошлункове введення щурам парацетамолу в дозі 300 мг/кг викликає зниження в клітинах печінки сумарного пулу низькомолекулярних SH-груп, яке, поряд з глутатіоном, включає цистеїн, що також бере участь в процесах детоксикації ксенобіотиків (мал.2).



Мал.2. Вміст низькомолекулярних SH-груп в печінці щурів.  
 1. Контроль, інтактний 2. Парацетамол  
 3. П+АК 4. П+Мт  
 5. П+ЛБ 6. П+СаП  
 7. П+АцЦ.

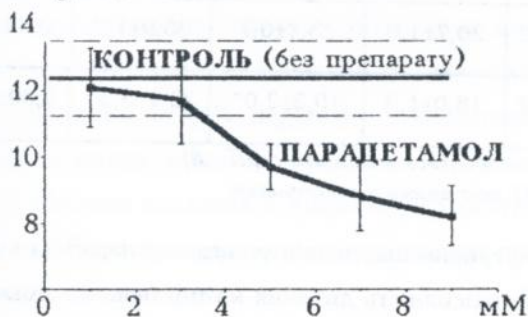
Спільне введення з парацетамолом його потенційних детоксикантів призводить до збереження низькомолекулярного SH-пулу печінки. Вірогідну захисну дію чинять детоксиканти з різним механізмом дії -

Вірогідну захисну дію чинять детоксиканти з різним механізмом дії - АцЦ, СаП та ЛБ, що свідчить про існування тісного взаємозв'язку різних систем детоксикаційного захисту печінки.

Подальшим етапом в ланцюзі послідовних подій, які призводять до розвитку токсичних ефектів парацетамолу, є взаємодія його метаболітів з SH-групами білків. Причому, мішенями можуть бути як структурні, так і функціональні білки гепатоцитів, які забезпечують діяльність життєвоважливих ферментних систем.

При інкубації ізольованих гепатоцитів із субтоксичною концентрацією парацетамолу (5 мМ), вміст АТФ в клітинах знижується в 4,6 рази, що вказує на пригнічення їх енергетичних функцій. Дійсно, парацетамол концентраційнозалежно пригнічує ендогенне дихання гепатоцитів (мал. 3).

нмоль  $O_2$ /хв/10<sup>6</sup> кл



Мал.3. Інтенсивність ендогенного дихання гепатоцитів шурів при інкубації з парацетамолом in vitro.

Аналіз дихальної активності гепатоцитів, інкубованих з 5мМ парацетамолу, характеризується незначним зниженням ендогенного дихання ( $V_{енд}$ ) порівняно з контролем (табл.2). При цьому, після додавання в середовище інкубації роз'єднувача - динітрофенолу ( $V_p$ ) та субстрату - сукцинату ( $V_{p, сукд}$ ), стимуляція дихання сукцинатом практично вдвічі нижча, ніж в пробах без препарату ( $\Delta V$  складає 1,2 та 2,7 відповідно). В умовах деструкції плазматичних мембран дигітоніном ( $V_{p, сукд, дигіт}$ ) в присутності парацетамолу інтенсивність дихання зростає лише на

15%, тоді як в контролі - на 57,7%. В цілому, це свідчить про порушення парацетамолом функціонування ферментів дихального ланцюгу мітохондрій. Пригнічення дихального ланцюгу антимицином А ( $V_{\text{ант}}$ ) в пробах без препарату викликає більш, ніж 30-кратне зниження споживання кисню гепатоцитами, тобто внесок "позамітохондріального" дихання в нормі складає не більше 3% (табл.2). При інкубації клітин з парацетамолом в субтоксичній концентрації спостерігається зростання антимицину А-резистентного дихання до 6,6%, тобто більш, ніж удвічі, що свідчить про активацію мікросомальних окислювальних процесів, які забезпечують цитохром-Р-450-залежний метаболізм парацетамолу.

Таблиця 2

Вплив парацетамолу на дихальну активність (нмоль  $O_2$ /хв/ $10^6$  кл) ізолюваних гепатоцитів щурів

Групи	$V_{\text{енд}}$	$V_p$	$V_p, \text{суцк}$	$V_p, \text{суцк, дигит.}$	$V_{\text{ант}}$
Контроль (без препарату)	14,1±1,2	20,7±1,0	23,4±0,7	36,9±1,2	0,44±0,02
Парацетамол (5мМ)	12,2±0,7	18,0±1,3	19,2±2,0*	22,1±3,3*	0,80±0,10*

Примітки: Кількість дослідів в кожній серії - 8;

\* -  $P < 0,05$  порівняно з контролем.

При 8-добовому внутрішньошлунковому введенні парацетамолу щурам в дозі 300 мг/кг інтенсивність дихання клітин печінки знижується на 45% порівняно з нормою (мал.4). Детоксиканти в різній мірі змінюють викликані парацетамолом порушення ендogenousного дихання. Вірогідний захисний ефект мають АК та АцЦ.

Одержані результати дозволяють передбачити, що мішенями токсичних метаболітів парацетамолу, в першу чергу, є ферменти мітохондрій, функціонування яких пов'язане з відновленістю SH-груп в активних центрах: сукцинатдегідрогенази, переносчиками фосфату, ді- та трикарбонових кислот через внутрішню мітохондріальну мембрану, цитохроми та залізо-сірчані центри дихального ланцюга.



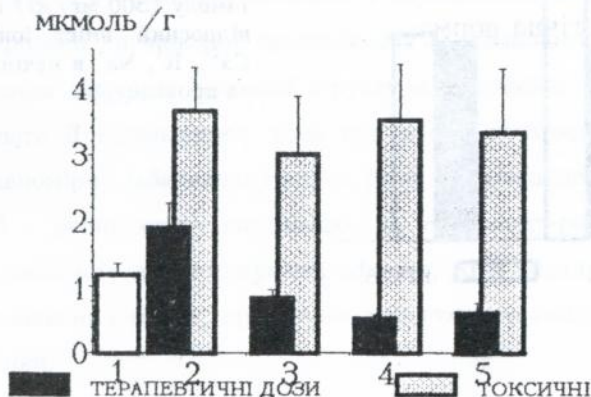
Мал.4. Вплив парацетамолу та його комбінацій з іншими лікарськими речовинами на відносну інтенсивність ендogenousного дихання зрізів печінки щурів.

1. Парацетамол 2. П+АК 3. П+Мт 4. П+ЛБ 5. П+СаП 6. П+АцЦ

\*  $P < 0,05$  у порівнянні з інтактним контролем;

\*\*  $P < 0,05$  у порівнянні з парацетамолом.

Вивчення перекисних та вільнорадикальних процесів свідчить про потенційну перекисну активність парацетамолу навіть в терапевтичній дозі (100 мг/кг, однократно). Субтоксична доза препарату (500 мг/кг, однократно) викликає вірогідне зростання хемілюмінесценції в тканині печінки на 129,1% порівняно з інтактним контролем, а також збільшення вмісту кінцевих продуктів перекисного окислення ліпідів (мал.5). Спільне введення в діапазоні терапевтичних доз парацетамолу з АСК та АК знижує вираженість перекисних процесів, в субтоксичних - не дає захисного ефекту.

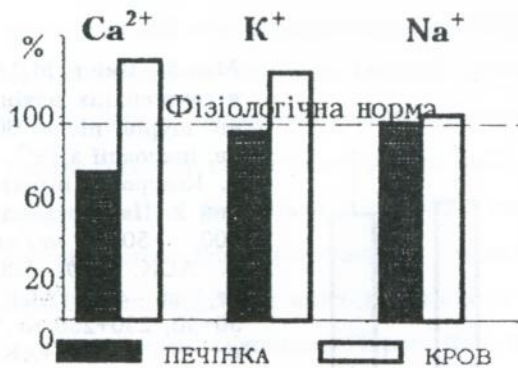


Мал.5. Вміст МДА в гомогенатах печінки щурів після 30 хв. інкубації з  $Fe^{2+}$ .

1. Контроль, інтактний 2. Парацетамол, 100, 500 мг/кг 3. АСК, 100, 500 мг/кг 4. П+АСК, 50+50, 250+250 мг/кг 5. П+АСК+АК, 50+50+25, 250+250+125 мг/кг.

8-добове введення щурам парацетамолу в дозі 300 мг/кг викликає при диференційній скануючій калориметрії зростання кількості поглинаємої тканиною печінки енергії на 31,5% порівняно з нормою. Зміна цього достатньо "жорсткого" показника свідчить про збільшення текучості та термолабільності рідкокристалічного ліпідного компоненту мембран. АцЦ та, в меншій мірі, СаП, введені разом з парацетамолом, виявляють помітний мембранозахисний ефект: 21,0 та 13,3%, відповідно.

Деструктивні процеси в мембранах та порушення структури і функцій мембранозв'язаних білків, що беруть участь в активному транспорті катіонів, призводять до мінерального дисбалансу в системі "печінка/кров", виявленому в даних експериментах. Найбільш глибокі зрушення при 8-добовому введенні парацетамолу (300 мг/кг) відбуваються в гомеостазі  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{K}^+$  (мал. 6, 7), тоді як  $\text{Na}^+$ -баланс практично не змінюється. Зростання вмісту в плазмі крові  $\text{K}^+$ -основного цитоплазматичного катіону, та  $\text{Ca}^{2+}$ , який, як відомо, зосереджений переважно в мітохондріях клітин, свідчать про деструктивні зміни, які в клінічній гепатології характеризуються як "мітохондріальний" некроз (Хазанов А.І., 1968).



Мал. 6. Вплив 8 добового введення парацетамолу (300 мг/кг) на відносний вміст іонів  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  в печінці та крові щурів.



Мал.7. Вплив парацетамолу та його комбінацій з іншими лікарськими речовинами на відносну величину коефіцієнтів  $Ca_{2+}/Ca_{+}$ ,  $K_{+}/K_{+}$ ,  $Na_{+}/Na_{+}$  в печінці та крові щурів.

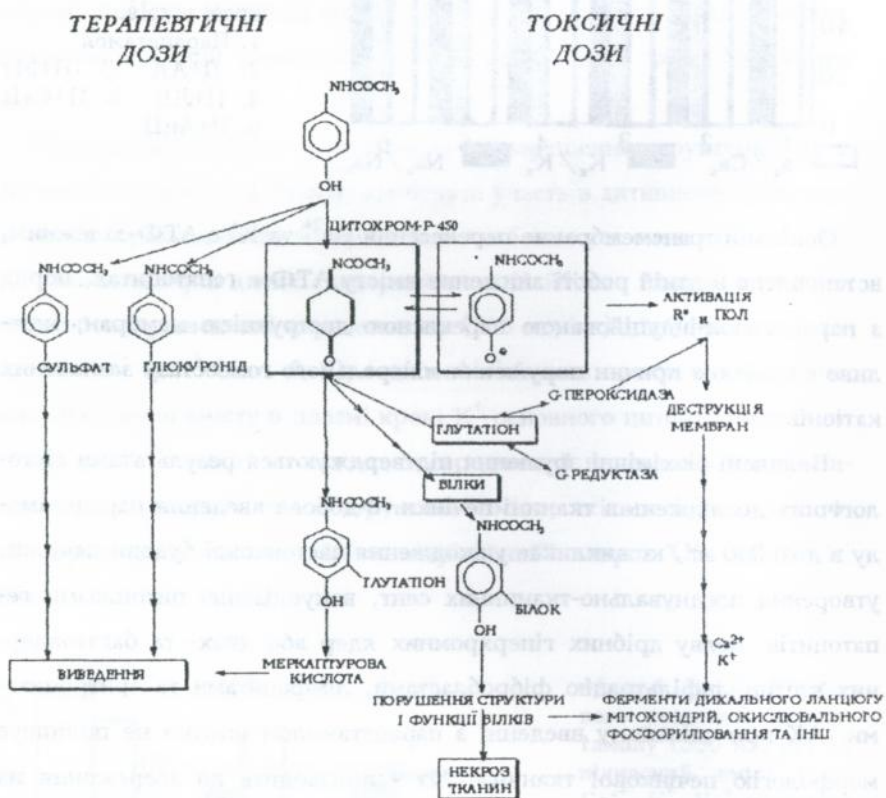
1. Парацетамол
2. П+АК    3. П+Мт
4. П+ЛБ    5. П+СаП
6. П+АцЦ.

Оскільки трансмембранне перенесення  $Ca^{2+}$  та  $K^{+}$  є АТФ-залежним, встановлене в даній роботі зниження вмісту АТФ в гепатоцитах, поряд з парацетамол-індуційованою перекисною деструкцією мембран, можливо є однією з причин порушення мінерального гомеостазу зазначених катіонів.

Виявлені біохімічні зрушення підтверджуються результатами гістологічних досліджень в тканині печінки. 8-добове введення парацетамолу в дозі 300 мг/кг викликає ушкодження часточкової будови печінки, утворення поєднувально-тканинних септ, вакуолізацію цитоплазми гепатоцитів, появу дрібних гіперхромних ядер або двох- та багатоядерних клітин, інфільтрацію фібробластами, лімфоцитами та еритроцитами. АК при спільному введенні з парацетамолом істотно не поліпшує морфологію печінкової тканини; Мт - призводить до збереження на окремих ділянках балочної структури паренхіми; ЛБ - до практично повного її відновлення, хоча при цьому гепатоцити дещо зменшені, нерівномірно забарвлені і мають різні за величиною та кількістю ядра. СаП - дещо знижуючи лімфо- та еритроцитарну інфільтрацію, не викликає істотних корегуючих ефектів. АцЦ виявляє максимальний гепатозахисний ефект, практично повністю нормалізуючи гістоструктуру печінки.

Систематизація сучасних даних та результати власних досліджень дозволили скласти цілісну уяву про механізми токсикодинаміки парацетамолу (схема 1).

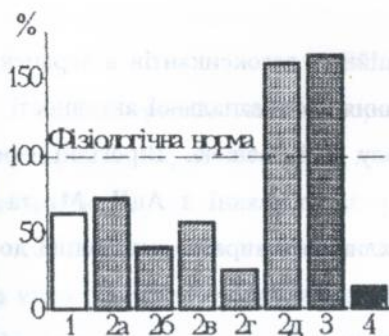
Схема 1. МЕТАБОЛІЗМ ПАРАЦЕТАМОЛА В ПЕЧІНЦІ



Істотний інтерес, поряд з гепатотоксичністю, являли малодосліджені аспекти гемотоксичності парацетамолу, оскільки клінічні дані свідчать про його негативні ефекти щодо червоної крові (Skoutakis V.A., 1982).

Встановлено, що 8-добове введення парацетамолу щурам (300 мг/кг) призводить до зниження загальної кількості міелокаріоцитів, часткової загибелі клітин кісткового мозку з істотним порушенням дифе-

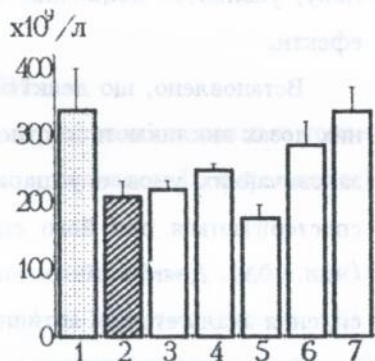
ренцювання гранулоцитів - чисельності та балансу клітин міелоїдного ряду. При цьому спостерігається виразний лімфо- та моноцитоз. Пригнічується "червоний паросток" кровотворення: кількість клітин еритроїдного ряду зменшується в 7,4 рази. Лейкоеритроїдне співвідношення істотно зростає (мал.8).



Мал.8. Вплив парацетамолу на відносний рівень показників кістково-мозкового кровотворення у щурів.

1. Міелокаріоцити 2. Клітини лейкоцитарного ряду: а - промієлоцити; б - мієлоцити; в - метамієлоцити; г - паличкоядерні; д - сегментоядерні гранулоцити 3. Лімфоцити 4. Клітини еритроцитарного ряду

$P < 0,05$  у порівнянні з контролем для всіх показників.



Мал. 9. Вплив парацетамолу та його комбінацій з іншими лікарськими речовинами на вміст міелокаріоцитів в кістковому мозку щурів.

1. Контроль, інтактний 2. Парацетамол 3. П+АК 4. П+Мг 5. П+ЛБ 6. П+СаП 7. П+АцЦ.

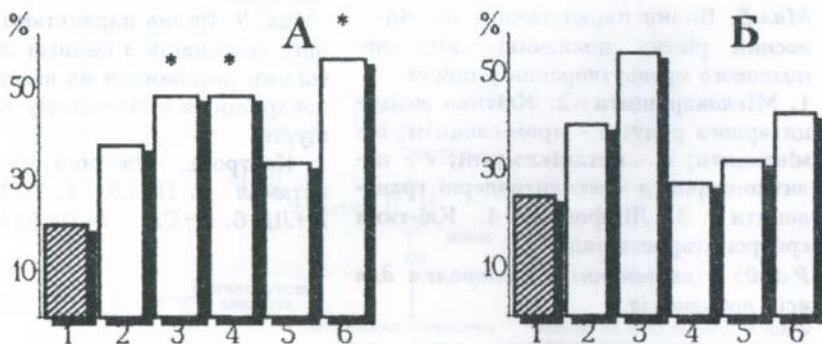
Такі виражені зміни кровотворення свідчать про загальну інтоксикацію, наявність осередкових некрозів, пригнічення регуляторних функцій печінкової та ниркової тканини, зокрема, продукції профактора еритропоєтинів та самих стимуляторів еритропоезу.

З п'яти досліджених потенційних детоксикантів, оптимальним щодо послаблення мієлотоксичності парацетамолу уявляється АцЦ (мал. 9). Певний інтерес являє ЛБ, який знижуючи чисельність міелокаріоцитів, викликає активацію "червоного паростка" кровотворення.

### 3. Дослідження фармакологічних ефектів комбінацій парацетамолу з іншими лікарськими речовинами

У зв'язку із задачами даної роботи, поряд із вивченням впливу потенційних детоксикантів на основні ланки токсикодинаміки парацетамолу, уявлялося доцільним оцінити їх вплив на його фармакологічні ефекти.

Встановлено, що деякі з потенційних детоксикантів в терапевтичних дозах викликають істотне зростання протизапальної активності, яка за звичайних умов є у парацетамолу найслабшою. Вірогідні ефекти спостерігаються при його спільному застосуванні з АцЦ, Мг та ЛБ (мал. 10А). Деякі з цих речовин викликають виразну тенденцію до посилення анальгетичної активності парацетамолу (мал. 10Б).



Мал. 10. Протизапальна (А) та анальгетична (Б) активність парацетамолу та його комбінацій з іншими лікарськими речовинами при карагеніновому набряку стопи щурів.

1. Парацетамол (150 мг/кг) 2. П+АК (150+75 мг/кг) 3. П+Мг (150+150 мг/кг) 4. П+ЛБ (150+60 мг/кг) 5. П+СаП (150+90 мг/кг) 6. П+АцЦ (150+60 мг/кг). \*  $P < 0,05$  порівняно з контролем.

В фіксованих прописах парацетамолу з АСК (Аскопар, Цитропак, Копацил), які замість фенацетину містять еквівалентну дозу парацетамолу, усі види специфічної фармакологічної активності зростають в 2-6 разів порівняно з ефектами відповідних монопрепаратів. Причинами

цього є фармакодинамічна адитивність (пригнічення циклооксигеназ в периферійних та нервових тканинах) та фармакокінетична взаємодія. Про це свідчать як дані власних досліджень (Лібіна В.В., Чайка Л.О., Поволоцька В.А., 1993), так і результати досліджень інших авторів (Von G. Engelhardt, 1984).

## ВИСНОВКИ

1. Експериментально і теоретично обґрунтовані механізми токсичних ефектів парацетамолу та досліджені можливості їх фармакологічної корекції.

2. Досліджені клітинні та системні токсичні ефекти парацетамолу. In vitro субтоксичними концентраціями є 1-10 мМ, токсичними - 10-20 мМ. In vivo при однократному введенні у шлунок щурам токсичними є дози порядку 900 мг/кг, при тривалому -  $\geq 300$  мг/кг. В реалізації токсичних ефектів вирішальне значення має не стільки висока разова доза парацетамолу, скільки тривалість застосування навіть при істотно меншому рівні доз.

3. Тривале введення парацетамолу щурам (8 діб по 300 мг/кг), яке моделює умови його неконтрольованого застосування людиною, викликає в печінці зниження пулу низькомолекулярних SH-груп на 23%, пригнічення ендogenous дихання тканин на 54,9%, зростання термолабільності клітинних мембран, порушення гомеостазу  $Ca^{2+}$  та  $K^{+}$  із зниженням їх балансу в системі "печінка/кров" на 45 та 26%, призводить до ушкодження гістоструктури печінки.

4. Встановлено, що мішенями токсичної взаємодії парацетамолу є ферменти мітохондріального дихання, інтенсивність якого в різних метаболічних станах падає на 13-50% із зниженням вмісту АТФ майже в 5 разів і більш ніж 2-кратним зростанням споживання  $O_2$  мікосомальними системами.

5. Вперше виявлено, що у вказаному режимі дозування (8 діб по

300 мг/кг) парацетамол пошкоджує кістково-мозкове кровоутворення, знижуючи кількість мієлокаріоцитів на 35,5%, пригнічуючи "червоний паросток" кровотворення в 7,4 рази, викликаючи дисбаланс клітин мієлоїдного ряду, лімфо- та моноцитоз.

6. Основні шляхи фармакологічної корекції токсичних ефектів парацетамолу повинні бути спрямовані на підвищення пулу низькомолекулярних SH-детоксикантів, пригнічення ПОЛ, активацію систем антиоксидантного захисту.

7. Вперше досліджено вплив потенційних детоксикантів парацетамолу - аскорбінової кислоти, метіоніну, лізину байкалінату, кальцію пантотенату, ацетилцистеїну - на ключові ланки його токсикодинаміки. Виявлені особливості механізмів їх детоксируючої дії. Встановлено, що аскорбінова кислота сприяє нормалізації клітинного дихання гепатоцитів; метіонін позитивно впливає на функціонування SH-залежних ферментних систем; лізину байкалінат нормалізує  $Ca^{2+}$ -гомеостаз в системі "печінка/кров", активує "червоний паросток" кровоутворення, знижуючи при цьому чисельність мієлокаріоцитів кісткового мозку; кальцію пантотенат підвищує низькомолекулярний SH-пул печінки, нормалізує мінеральний гомеостаз та кістково-мозкове кровоутворення. Найширший спектр захисних ефектів виявляє ацетилцистеїн.

8. Ацетилцистеїн, метіонін, лізину байкалінат виявляють потенціюючий вплив на протизапальну активність парацетамолу. Комбінування АСК з парацетамолом є доцільним як в плані зниження токсичності, так і з точки зору підвищення його фармакологічної ефективності.

## ПУБЛІКАЦІЇ ОСНОВНИХ ПОЛОЖЕНЬ ДИСЕРТАЦІЙНОЇ РОБОТИ

1. Влияние парацетамола и его комбинаций с ацетилсалициловой и аскорбиновой кислотой на процессы перекисного окисления липидов в печени крыс / Чайка Л.А., Поволоцкая В.А., Либина В.В. и др. // Эксперим. и клин. фармакология - 1996. - № 1. - С. 43-46.

2. Поволоцкая В.А., Чайка Л.А., Петренко А.Ю. Влияние некото-

рых лекарственных средств на нарушения дыхания, вызванные парацетамолом//Фармаком - 1995. - № 5. - С. 21-24.

3. Влияние парацетамола и его комбинаций с ацетилцистеином и Са-пантотенатом на термодинамические характеристики мембранных структур гепатоцитов/Чайка Л.А., Поволоцкая В.А., Лисецкий Л.Н. и др.//Фармаком - 1995. - № 7. - С. 20-22.

4. Чайка Л.О., Поволоцкая В.А. Дослідження механізмів деяких токсичних ефектів парацетамолу//Сучасні проблеми фармакології: Мат-ли конф. - Полтава, 1995. - С.179.

5. Порівняльне вивчення токсикодинаміки деяких фенацетин- та парацетамолмістивних комбінованих препаратів/Чайка Л.О., Вертяева О.Н., Лукашев С.В. та інші.//Школа академіка О.І.Черкеса: ідеї, розвиток, перспективи: Матер. конф. - Київ, 1994. - С. 155.

6. Комбинированные таблетки "Цитропак": фармакодинамика и фармакокинетика/Либина В.В., Чайка Л.А., Поволоцкая В.А., Андрианова Т.В.//Перспективы создания и производства лекарственных средств в Украине: Тез. докл. научно-практ. конф. - Одесса, 1993. - С. 258-260.

7. О фармакологическом взаимодействии ацетилсалициловой кислоты и парацетамола/Либина В.В., Чайка Л.А., Поволоцкая В.А. и др.//Человек и лекарство: Тез.докл. II Рос.нац.конгресса - М., 1995.- С.31.

8. Сравнительная токсикодинамика фенацетин- и парацетамолсодержащих препаратов/Чайка Л.А., Вертяева О.Н., Лукашев С.В. и др.//Человек и лекарство: Тез.докл. II Рос.нац.конгресса - М., 1995.- С.57.

9. Исследование возможности фармакологической коррекции гемотоксических эффектов парацетамола/Поволоцкая В.А., Тимченко В.Г., Чайка Л.А., Френкель Л.А.//Научные достижения и проблемы производства лекарственных средств: Тез. докл. научно-практ. конф. - Харьков, 1995. - С. 228-230.

10. Влияние парацетамола, фенацетина и амидопирина на клеточное дыхание гепатоцитов/Петренко А.Ю., Поволоцкая В.А., Либина В.В., Чайка Л.А.//Человек и лекарство: Тез.докл. III Рос. нац. конгр. - М., 1996. - С. 185.

## АННОТАЦИЯ

**Поволоцкая В.А. Фармакологическая коррекция токсических эффектов парацетамола.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.08 - фармакология. Одесский государственный медицинский университет, Одесса, 1997.

На основании исследований механизмов токсикодинамики парацетамола, экспериментально обоснованы рекомендации к разработке новых оригинальных комбинированных препаратов, которые отличаются от моноформ парацетамола более высокой безопасностью и эффективностью. Разработаны, внедрены в производство комбинированные препараты с парацетамолом - Аскопар, Цитропак, Копацил.

*Ключевые слова:* парацетамол, фармакодинамика, токсикодинамика, комбинированные препараты.

## SAMMARY

**Povolotskaya V.A. Pharmacological correction of paracetamol toxic effects.**

Dissertation for scientific degree of biological sciences on speciality 14.03.08. - Pharmacology. Odessa state medical university, Odessa, 1997.

Recommendations to development of new original combined drugs which differ from paracetamol monoforms by higher safety and effectivity are experimentally justified on the basis of researches of mechanisms of paracetamol toxicodynamic. Combined medicines with paracetamol - Ascopar, Cytropac and Copacyl are developed and introduced in manufacture.

*Key words:* paracetamol, pharmacodynamic, toxicodynamic, combined medicines.

---

Подписано к печати 24.12.96 г. Формат 60x84.

Бумага типографская. Печать офсетная. Объем 1,5 печ.листа.

Тираж 100 экз.

---

Отпечатано НПП "Инфотехсервис" г. Харьков,  
ул. Мироносицкая, 25



435031

AB 37.085

**AB 37.085**