

К МЕХАНИЗМУ СЕЗОННОЙ ХРОНОРЕАКТИВНОСТИ ТЕТРАХЛОРОМЕТАНА

¹ФБУН «Федеральный научный центр гигиены имени Ф.Ф. Эрисмана» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 141014, Московская область, Мытищи;

²Институт биомедицинских исследований Владикавказского научного центра РАН, 362025, Владикавказ

Введение. Сезонные биоритмы способны модифицировать токсическое действие ксенобиотиков. В основе одного из механизмов этого явления могут быть естественные колебания в крови андрогенов, влияющих на процессы метаболизма в печени. Изучение эффекторной роли тестостерона в сезонной хронореактивности позволит вскрыть одно из звеньев в патогенезе и корректнее оценить химические риски для здоровья людей, особенно применяющих гормонотерапию.

Цель работы – изучение роли тестостерона в механизмах хронореактивности токсического эффекта тетрахлорметана у теплокровных животных.

Материал и методы. Исследования проведены на половозрелых самцах крыс линии Wistar, разделённых на группы негативного контроля, модельную с CCl₄-индуцированным токсическим гепатитом и опытную, в которой экспозиция CCl₄ осуществлялась после предварительного 7-дневного курса введения тестостерона. Определялись прямой и общий билирубин, холестерин, щелочная фосфатаза, АлАТ и АсАТ, гидроперекиси и малоновый диальдегид по стандартным методикам. Весь эксперимент повторялся дважды: зимой и весной.

Результаты. Степень повреждения структур и функций гепатоцитов от разового введения одной и той же дозировки яда зимой и весной проявлялась по-разному, выявляя модуляторную роль биологических ритмов. На фоне премедикации тестостероном в обеих сериях эксперимента (зима, весна) наблюдалась схожая тенденция: токсическое действие CCl₄ усиливалось. Это фиксировалось следующими биохимическими изменениями: билирубин повышался на 55%, холестерин на 19%, щелочная фосфатаза на 12%, АлАТ на 17%, АсАТ на 35%, гидроперекиси на 29%, малоновый диальдегид повышался незначительно (относительно групп с модельным токсическим гепатитом).

Заключение. Одним из эффекторных звеньев в феноменах сезонной хронореактивности выступает мужской половой гормон, регулирующий метаболическую активацию цитохромов в гепатоцитах, осуществляющих биотрансформацию. Раскрытие всего механизма позволит разработать эффективную систему хронопрофилактики и снизить риски токсического отравления у лиц в периоды максимальной хронореактивности.

Ключевые слова: сезонные биоритмы; стероидные гормоны; химические риски для здоровья; хронореактивность; хронотоксикология.

Для цитирования: Скупневский С.В. К механизму сезонной хронореактивности тетрахлорметана. Гигиена и санитария. 2019; 98 (3): 328-331. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2019-98-3-328-331>

Для корреспонденции: Скупневский Сергей Валерьевич, канд. биол. наук, науч. сотр. ФБУН «Федеральный научный центр гигиены имени Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, Московская область, Мытищи. E-mail: dreammas@yandex.ru; pesticidi@fferisman.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов

Поступила 13.01.2019

Принята к печати 06.02.2019

Skupnevskij S.V.^{1,2}

TO THE MECHANISM OF SEASONAL VARIATIONS IN CARBON TETRACHLORIDE TOXICITY

¹F.F. Erisman Federal Scientific Center for Hygiene named after of the Federal Service for Supervision in Protection of the Rights of Consumer and Man Wellbeing, Mytishchi, Moscow Region, 141014, Russian Federation;

²Institute of Biomedical Investigations - the Affiliate of Vladikavkaz Scientific Centre of RAS, 362025, Vladikavkaz, Russian Federation

Introduction. Seasonal biorhythms can modify the toxic effect of xenobiotics. Natural fluctuations in hormone levels in the blood which can modify the metabolic processes in the liver can be the base of one of the mechanisms in this phenomenon. The study of the effector role of testosterone in seasonal chrono-reactivity can reveal one new link in the pathogenesis and will improve health risk assessment, especially in patients taking hormone therapy.

The aim of the study was to reveal the role of testosterone in the mechanisms of chrono-reactivity the toxic effect for carbon tetrachloride in warm-blooded animals.

Material and Methods. Studies were conducted on adult male Wistar rats, divided into negative control groups, a model with CCl₄-induced toxic hepatitis, and experimental in which CCl₄ exposure was carried out following a preliminary 7-day course of testosterone administration. Direct and total bilirubin, cholesterol, alkaline phosphatase, ALAT and AsAT, hydroperoxide and malondialdehyde were determined by standard methods. The experiment was repeated twice: both in winter and spring.

Results. The amplitude of the damage to the structures and functions of hepatocytes from a single injection of the same poison dosage in winter and spring manifested in varying degrees, revealing the modulatory role of biological rhythms. Under premedication with testosterone, a similar tendency was observed in both series of the experiment (winter, spring): the toxic effect of CCl₄ increased. This was recorded by the following biochemical changes: bilirubin increased by 55%, cholesterol - 19%, alkaline phosphatase - 12%, ALAT - 17%, AsAT - 35%, hydroperoxide - 29%, and malonic dialdehyde slightly (relative to groups with model toxic hepatitis).

Conclusion. The male sex hormone regulating the metabolic activation of cytochromes in hepatocytes performing biotransformation is one of the effector links in the seasonal chrono-reactivity phenomena. The discovery of the whole

mechanism will allow developing an effective system of chronoprophylaxis and reducing the risks of toxic poisoning in individuals during periods of maximum chrono-reactivity.

Key words: *chemical health risks; chronoreactivity; chronotoxicology; seasonal biorhythms; steroid hormones.*

For citation: Skupnevskii S.V. To the mechanism of seasonal variations in carbon tetrachloride toxicity. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2019; 98(3): 328-331. (In Russ.). DOI: 10.18821/0016-9900-2019-98-3-328-331

For correspondence: *Sergey V. Skupnevskii*, MD, Ph.D., Researcher of the F.F. Erisman Federal Scientific Center for Hygiene named after of the Federal Service for Supervision in Protection of the Rights of Consumer and Man Wellbeing, Mytishchi, Moscow Region, 141014, Russian Federation. E-mail: dreammas@yandex.ru; pesticidi@fferisman.ru

Information about the author: Skupnevskii S.V. <http://orcid.org/0000-0002-6233-5944>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The author declare no conflict of interest.

Received: 13 January 2019

Accepted: 06 February 2019

Введение

Эндокринная система регуляции относится к числу наиболее сложно устроенных, поскольку один и тот же гормон может обладать множественным действием. Участвующие непосредственно в половой дифференцировке организмов гонадостероиды способны оказывать дополнительное регулирующее воздействие на процессы метаболизма в печени. В научной литературе описано множество примеров, иллюстрирующих модулирующий эффект андрогенов и эстрогенов в отношении фармакологических препаратов и токсических химических веществ. В работе [1] отмечается, что половые различия определяют фармакокинетику, фармакодинамику и потенцирующие эффекты совместного применения лекарственных средств. Авторы также отмечают, что в основе одного из механизмов возрастных изменений в восприимчивости организма к действию химиотерапии лежит дисбаланс в эндокринной системе. Отечественными учёными показано, что гормональный статус влияет на обменные процессы в печени и это проявляется колебаниями токсичности антибиотиков или ядов [2, 3]. В статье [4] обращается внимание на проблему канцерогенных рисков со стороны генистеина – широко распространённого изофлавона, содержащегося во многих растительных продуктах. Полученные в работе результаты показали, что действие андрогенов и эстрогенов выражается по-разному, опосредуя эффект генистеина с антиканцерогенного на промотирующий.

Описанные в литературе сезонные и годовые флуктуации токсичности химических веществ и лекарственных препаратов [5–11] также могут иметь в своей основе колебания половых гормонов, обеспечивающих гомеостаз в непрерывно меняющихся внешних условиях. Это обстоятельство требует более детального изучения механизмов сочетанного воздействия на метаболический аппарат гепатоцитов половых гормонов и химических веществ. К их числу может быть отнесён тетрахлорметан, который не только широко используется в качестве эффективного растворителя, но и образуется в питьевой воде при её хлорировании [12, 13]. Его молекула обладает канцерогенным, гепатотропным, мутагенным и др. действиями [14–18]. В этой связи изучение управляющих механизмов в токсикодинамике четырёххлористого углерода, имеющих в своем основании биологические ритмы, является актуальным, поскольку направлено на решение проблемы снижения рисков здоровью населения со стороны загрязнителей окружающей среды.

Цель работы – изучение роли тестостерона в механизмах хронореактивности токсического эффекта тетрахлорметана у теплокровных животных.

Материал и методы

В работе использовано 48 крыс-самцов линии *Wistar* в возрасте 90 ± 5 дней. Животные содержались на стандартной диете вивария. Первая группа животных составила негативный контроль («Нег. к.» введение растворителей в тех же объёмах и по тем же схемам, что в двух последующих опытных группах). Вторая группа – модельные с индуцированным острым токсическим поражением печени [19] путём однократного введения 50%-го масляного раствора тетрахлорметана (раствори-

тель – оливковое масло) в дозировке 0,4 мл/100 г *per os* (кроме этого в течение семи дней животные получали внутримышечные инъекции оливкового масла в эквивалентных количествах с животными из третьей группы). Третья группа – животные, которым на протяжении семи дней однократно (1 раз в день) внутримышечно вводили тестостерон из расчета 5 мг/кг, разбавленный в пропорции 1:5 из исходного 5%-го масляного раствора. На шестые сутки этим животным вводили внутривенно раствор тетрахлорметана в той же дозировке, что и модельным крысам. Через 24 часа после введения гепатотоксина животные усыплялись (внутрибрюшинное введение «Золетил», Франция), из сердца отбиралась кровь в объёме 3–4 мл, в плазме которой на автоматическом биохимическом анализаторе определялись показатели печёночного комплекса. Для определения прямого и общего билирубина (по методу Мэллой-Эвелина), общего холестерина (энзиматическим колориметрическим методом) использовались стандартные биохимические наборы фирмы Vital Diagnostics (С.-Пб.), щелочной фосфатазы – наборы фирмы ERBA Lachema (Чехия). Измерение аланин- и аспартат-трансаминазы осуществлялось по методу Райтмана–Френкель (с помощью наборов фирмы Vital Diagnostics), но в модификации. Её суть заключалась в том, что время инкубации было значительно сокращено – до 15 минут, а рекомендуемый объём субстратов для АлАТ и АсАТ увеличен – таким образом, чтобы линейность сохранялась до 15 мккат/л.

Гидроперекиси (ГП) определялись в плазме крови по Гаврилову с использованием наборов фирмы «Агат-Мед» (Россия), малоновый диальдегид (МДА) в эритроцитах – по реакции с тиобарбитуровой кислотой после предварительного осаждения белков трихлоруксусной кислотой.

Принципы работы с животными строились на учёте рекомендаций, изложенных в правилах этического (гуманного) обращения. Эксперименты проводились в декабре и апреле («Зима» и «Весна» соответственно). В каждой группе находилось по 8 животных, результаты биохимических показателей крови которых обрабатывались статистически в программе Excel, дополненной опцией AtteStat. Рассчитывалось среднее значение (M) и стандартная ошибка среднего ($\pm m$). Сравнение гипотез осуществлялось на основании использования непараметрической статистики по U-критерию Манна–Уитни.

Результаты

Согласно результатам проведенных исследований, тестостерон способен оказывать модифицирующий эффект на хронотоксикологический профиль тетрахлорметана (см. таблицу).

Однократное введение высокой дозировки четырёххлористого углерода вызывало острое токсическое отравление у животных, которое обнаруживалось негативными изменениями соответствующих биохимических показателей печени: достоверно и многократно повышался уровень билирубина (как прямого, так и общего – до 15 раз), холестерина. Отмеченные процессы протекают на фоне цитолиза гепатоцитов, сопровождающихся повышением продуктов перекисного окисления липидов (ГП и МДА) и, как следствие, выходом в кровяное русло соответствующих маркеров: АлАТ, АсАТ и щелочной фосфатазы. Величина

Токсикологические исследования тетрахлорметана в условиях гипертестостеронемии

Показатель	Зима			Весна		
	негативный контроль	CCl ₄	Тестостерон + CCl ₄	негативный контроль	CCl ₄	Тестостерон + CCl ₄
Билирубин прямой, мкмоль/л	1,10 ± 0,26	17,40 ± 3,20	18,40 ± 3,13	1,10 ± 0,07	10,60 ± 2,94	16,50 ± 4,92
<i>p</i>	0,001*	0,141**	0,916***	0,012*		0,529***
Билирубин общий, мкмоль/л	1,90 ± 0,32	20,40 ± 3,72	21,7 ± 3,38	2,00 ± 0,16	12,10 ± 3,09	18,70 ± 5,54
<i>p</i>	0,001	0,093	0,875	0,012		0,564
Холестерин, ммоль/л	1,50 ± 0,08	2,10 ± 0,20	2,50 ± 0,21	1,60 ± 0,05	2,50 ± 0,10	2,70 ± 0,18
<i>p</i>	0,046	0,128	0,372	0,001		0,401
Щелочная фосфатаза, МЕ/л	417,00 ± 29,86	663,00 ± 36,37	743,00 ± 42,95	549,00 ± 12,98	1003 ± 79,68	897,00 ± 36,02
<i>p</i>	0,001	0,003	0,172	0,001		0,128
АлАТ, мккат/л	0,26 ± 0,02	5,85 ± 0,66	6,85 ± 0,53	0,25 ± 0,01	5,55 ± 0,54	6,07 ± 0,81
<i>p</i>	0,001	0,834	0,674	0,001		0,916
АсАТ, мккат/л	0,20 ± 0,01	2,97 ± 0,33	4,01 ± 0,16	0,27 ± 0,01	2,09 ± 0,26	2,58 ± 0,31
<i>p</i>	0,001	0,027	0,036	0,001		0,141
Коэффициент де Ритиса	0,80 ± 0,05	0,52 ± 0,03	0,61 ± 0,06	1,06 ± 0,02	0,37 ± 0,02	0,43 ± 0,02
<i>p</i>	0,001	0,003	0,115	0,001		0,046
ГП, мкмоль/л	5,60 ± 0,19	7,65 ± 0,69	9,85 ± 0,63	6,96 ± 0,23	7,78 ± 0,68	7,36 ± 0,72
<i>p</i>	0,027	0,753	0,054	0,529		0,600
МДА, мкмоль/л	52,13 ± 1,21	45,0 ± 1,27	44,0 ± 1,27	36,05 ± 1,91	67,64 ± 2,40	68,4 ± 1,56
<i>p</i>	0,002	0,001	0,529	0,001		0,916

Примечание. * – Контроль / CCl₄; ** – CCl₄ / CCl₄ в серии «зима/весна»; *** – CCl₄ / Тестостерон + CCl₄.

коэффициента де Ритиса ($RdR \ll 1$) свидетельствует об остром течении индуцированной патологии [20].

Сравнение биохимических показателей у животных опытных групп «зима/весна» с модельным токсическим гепатитом показывает, что фактор сезонности проявился в выраженном модулирующем воздействии на патогенез. При этом в зимний период оказывается повышенным билирубин (прямой на 64%, общий – на 69%), активность АлАТ (на 42% достоверно); в весенний период повышалась активность щелочной фосфатазы на 34% и продуктов распада клеточных мембран – МДА (на 50%), отличия в обоих случаях достоверные.

Сравнивая результаты, полученные для животных из групп «CCl₄» и «CCl₄+Тестостерон», следует отметить отчётливую тенденцию к усилению токсических проявлений модельного яда в условиях изменённого гормонального статуса. Премедикация тестостероном приводит к увеличению содержания билирубина в крови до 55%, холестерина до 14%. Оказываются также повышенными маркеры цитолиза гепатоцитов – АлАТ и АсАТ (до 23 и 35% соответственно), щелочная фосфатаза – на 34%. Важной особенностью, выявленной в ходе экспериментальных исследований, является то, что в различные сезоны года модулирующий эффект тестостерона на одни и те же показатели проявляется по-разному. В весенний период более хронорегулируемой оказывается дезинтоксикационная функция гепатоцитов (обмен билирубина), а в зимний больше проявляется общетоксический эффект ТХМ. Его следствием служит нарушение проницаемости клеточных мембран, сопровождаемое выходом в кровь гепатоспецифических ферментов АлАТ и АсАТ (достоверно) [21]. Эти события регистрируются на фоне повышения первичных продуктов перекисного окисления липидов – гидроперекисей ($p = 0,054$).

Обсуждение

Результаты проведённых исследований согласуются с данными литературы в аспектах, касающихся потенцирующего воздействия тестостерона на токсические эффекты химических веществ. В работе [22] авторы пишут, что у крыс существуют индуцибельные к воздействию половых гормонов гены, кодирующие ферменты из семейства цитохромов (СYP). В свою очередь, использованные в представленном эксперименте самцы

крыс отобраны в возрасте, характеризующемся максимальным содержанием в крови тестостерона [23], а следовательно и содержанием СYP P450, на которых протекает метаболическая активация CCl₄ [24]:



Факты повышенного содержания в крови гепатоспецифических ферментов у животных, получавших тестостерон, могут объясняться с позиций усиленной конверсии гепатотропного яда, инициирующего запуск процессов липопероксидации. Прямым доказательством этой гипотезы служат также данные о достоверном возрастании в крови животных зимней группы маркера перекисного окисления липидов – гидроперекисей. Это обосновывает увеличение риска интоксикации для лиц, практикующих гормонотерапию и спортсменов, употребляющих андрогены, особенно в периоды, характеризующиеся максимальной хронореактивностью.

Несмотря на определённую сенсibiliзирующую роль тестостерона в потенцировании эффектов ТХМ, весь механизм сезонной хронотоксикодинамики не может быть полностью объяснён с позиций регуляторного воздействия половых гормонов. Аргументом в пользу этой гипотезы выступает то, что в зимней группе «CCl₄» по ряду ключевых параметров диагностируется более выраженная картина отравления (по сравнению с весенней), а согласно данным литературы этот период характеризуется минимальным содержанием в крови животных половых гормонов [25]. С другой стороны, анализ статистических данных, охватывающих большую численную выборку, свидетельствует, что в человеческой популяции пик смертности (вне зависимости от анализа конкретных причин) среди разновозрастных групп приходится на декабрь–январь [26]. Такая закономерность объясняется одним из центральных мест биоритмов в управляющей системе организма, не раскрывая причин наблюдаемого явления.

Заключение

Модулирующий эффект тестостерона на биотрансформацию тетрахлорметана выявляет эфферентную роль половых гормонов в хронестезии. Раскрытие всего механизма сезонной хронореактивности позволит глубже понять фундаментальные

принципы функционирования биосистем в пространственно-временных условиях и усовершенствовать систему профилактики, включив в неё биоритмологическую компоненту.

Л и т е р а т у р а

(пп. 1, 4, 7, 8, 14–18, 20–26 см. References)

2. Скакун Н.П., Цилжурик И.Т., Волкова Л.А., Кудин А.Т. Сезонные особенности экскреторной функции печени при тетрациклиновых поражениях и коррекция нарушений антиоксидантами. *Антибиотики*. 1983; 28 (10): 757-60.
3. Якобсон Г.С., Добровольская С.Г., Вакула Г.М. Влияние пола и фазы эстрального цикла на интенсивность процессов повреждения и восстановления в печени крыс после острой интоксикации четыреххлористым углеродом. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1978; 85 (4): 460-4.
5. Арушанян Э.Б. *Хронофармакология*. Ставрополь: СГМА, 2000.
6. Скакун Н.П., Высоккий И.Ю. Сезонные особенности гепатотоксичности тетрациклина. *Антибиотики*. 1984; 29 (1): 42-5.
9. Чибисов С.М., Рапопорт С.И., Благоднаров М.Л., ред. *Хронобиология и хрономедицина*. М.: РУДН, 2018.
10. Рапопорт С.И., Фролов В.А., Хетагурова Л.Г., ред. *Хронобиология и хрономедицина: руководство*. М.: ООО «Мед. инф. агентство», 2012.
11. Комаров Ф.И., ред. *Хронобиология и хрономедицина*. М.: Медицина, 1989.
12. Землянова М.А., Пустовалова О.В., Мазунина Д.Л., Сбоев А.С. Биохимические маркерные показатели негативных эффектов у детей при воздействии хлорорганических соединений с питьевой водой. *Гигиена и санитария*. 2016; 95 (1): 97-101.
13. Землянова М.А., Карпова М.В., Новоселов В.Г. Оценка стабильности генома у детей при длительной экспозиции тетрахлорметаном из питьевой воды. *Здоровье населения и среда обитания*. 2015; 273 (12): 36-41.
19. Хабриев Р.У., ред. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. М.: Медицина, 2005.

References

1. Soldin O.P., Chung S.H., Mattison D.R. Sex Differences in Drug Disposition. *J Biomed Biotechnol*. 2011; 2011: 187103. doi: 10.1155/2011/187103.
2. Skakun N.P., Ciljurik I.T., Volkova L.A., Kudin A.T. Seasonal features of the liver excretory function by tetracycline damage and correction of disorders with antioxidants. *Antibiotiki*. 1983; 28 (10): 757-760. (in Russian)
3. Jakobson G.S., Dobrovol'skaja S.G., Vakula G.M. Effects of sex and phase of the estrous cycle on the intensity of damage and recovery processes in the rat liver after acute intoxication with carbon tetrachloride. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny*. 1978; 85 (4): 460-4. (in Russian)
4. Liu Y., Santillo M.F., Flynn T.J., Ferguson M.S. Sex hormone modulation of both induction and inhibition of CYP1A by genistein in HepG2/C3A cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2015; 51 (4): 426-431. doi: 10.1007/s11626-014-9848-9.
5. Arushanjan E.B. *Chronopharmacology*. Stavropol': SGMA, 2000. (in Russian)
6. Skakun N.P., Vysockij I.Ju. Seasonal features of tetracycline hepatotoxicity. *Antibiotiki*. 1984; 29 (1): 42-5. (in Russian)

7. Seawright A.A., Steele D.P., Menrath R.E. Seasonal Variations in Hepatic Microsomal Oxidative Metabolism *in vitro* and Susceptibility to Carbon Tetrachloride in a Flock Sheep. *Australian Veterinary Journal*. 1972; 48: 488-94.
8. Wolfe G.W., Schnell R.C. Annual Differences in Daily Variations in Hepatic Drug Metabolizing Enzyme Activity and Plasma Hormone Levels in Rat. *Pharmacology*. 1979; 19: 116-20.
9. Chibisov S.M., Rapoport S.I., Blagonravov M.L., red. *Chronobiology and chronomedicine*. М.: RUDN, 2018. (in Russian)
10. Rapoport S.I., Frolov V.A., Hetagurova L.G., red. *Chronobiology and chronomedicine: The manual*. М.: ООО «Med. inf. agentstvo», 2012. (in Russian)
11. Komarov F.I., red. *Chronobiology and chronomedicine*. М.: Medicina, 1989. (in Russian)
12. Zemljanova M.A., Pustovalova O.V., Mazunina D.L., Sboev A.S. Biochemical indicators of negative effects in children with exposure of organochlorine compounds in drinking water. *Gigiena i Sanitarija [Hygiene and Sanitation, Russian journal]*. 2006; 95 (1): 97-101. (in Russian)
13. Zemlyanova M.A., Karpova M.V., Novosyolov V.G. Assessment of genome stability in children with long-term exposure to carbon tetrachloride in drinking water. *Zdorov'e naselenija i sreda obitanija*. 2015; 273 (12): 36-41. (in Russian)
14. *Toxicological profile for carbon tetrachloride*. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2005.
15. Clawson G.A. Mechanisms of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pathol Immunopathol Res*. 1989; 8 (2): 104-12.
16. McGregor D., Lang M. Carbon tetrachloride: genetic effects and other modes of action. *Mutat Res*. 1996; 366 (3): 181-95.
17. Burcham Ph.C. *An Introduction to Toxicology*. Springer Science & Business Media, 2014.
18. Nwidi L.L., Oboma Y.I., Elmorsy E., Carter W.G. Alleviation of carbon tetrachloride-induced hepatocellular damage and oxidative stress with a leaf extract of *Glyphae brevis* (Tiliaceae). *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2018; 29 (6): 609-19. doi: 10.1515/jbcp-2017-0058.
19. Khabriev R.U., ed. *The manual for experimental (preclinical) study of new pharmacological substances*. М.: OJSC «Izdatel'stvo «Medicina», 2005. (in Russian)
20. Giannini E.G., Testa R., Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ*. 2005; 172 (3): 367-79. doi: 10.1503/cmaj.1040752.
21. Kamel H.H., Sarhan R.M., Saad Gh.A. Biochemical assessment of oxidative status versus liver enzymes in patients with chronic fascioliasis. *J Parasit Dis*. 2015; 39 (4): 628-33. doi: 10.1007/s12639-014-0431-9.
22. Flynn T.J., Ferguson M.S. An *in vitro* system for studying potential biological mechanisms of human sex differences in susceptibility to acute liver injury. *Toxicol Lett*. 2010; 198 (2): 232-6. doi: 10.1016/j.toxlet.2010.07.003.
23. Lee V.W.K., De Kretser D.M., Hudson B., Wang C. Variations in serum FSH, LH and testosterone levels in male rats from birth to sexual maturity. *J Reprod Fert*. 1975; (42): 121-6.
24. Weber L.W., Boll M., Stampf A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol*. 2003; 33 (2): 105-36. DOI: 10.1080/713611034.
25. Schradin C. Seasonal changes in testosterone and corticosterone levels in four social classes of a desert dwelling sociable rodent. *Hormones and Behavior*. 2008; 53: 573-9.
26. Parks R.M., Bennett J.E., Foreman K.J., Toumi R., Ezzati M. National and regional seasonal dynamics of all-cause and cause-specific mortality in the USA from 1980 to 2016. *eLife*. 2018; 7: e35500. doi: 10.7554/eLife.35500.