



## Протективный эффект Бициклола при алкоголь-индуцированном поражении печени в модели на мышах.

Jing Zhao, Hui Chen, Yan Li

*Департамент развития новых лекарственных средств, Институт Материя Медика, Китайская Академия Медицинских Наук и Пекинский Медицинский колледж.*

Получено 23 октября 2007г, получено в ревидированной форме 4 февраля 2008г, принято в печать 13 февраля 2008г, доступно в онлайн 29 февраля 2008г

### Абстракт

Окислительный стресс, сверхэкспрессия цитокинов, и активация клеток Купфера являются задокументированными патологическими факторами развития алкогольной болезни печени. Бициклол – новый синтетический лекарственный препарат с противовоспалительными и антиоксидативными свойствами. Настоящее исследование было посвящено изучению влияния Бициклола на острое алкоголь-индуцированное повреждение печени и сопутствующие ему механизмы у мышей. Бициклол (200, 300 мг/кг) вводился подопытным мышам через зонд трижды. Алкоголь (6г/кг) назначался перорально через 1 час после последней дозы Бициклола. Все животные забивались в разные временные промежутки после получения алкоголя. Повреждение печени оценивалось биохимически и гистопатологически. Липидная пероксидация и антиоксидантная активность измерялись спектрофотометрическим методом. Экспрессия цитокинов и CD 14 определялись энзим-связанным иммуносорбентным методом, цепной обратной-транскриптазно-полимеразной реакцией и иммуногистохимическим методом. В результате было доказано, что превентивное введение Бициклола существенно защищает печень при остром алкогольном повреждении, что выражается уменьшением активности сывороточных трансаминаз и уровня печеночных триглицеридов, ослаблением гистопатологических изменений в печени у мышей. В дополнение, бициклол заметно угнетает образование реактивных соединений тио-барбитуровой кислоты и восстанавливает антиоксидантную защиту, включая глутатион, супероксиддисмутазу, каталазу, глутатион-пероксидазу и глутатион-редуктазу. Сверхэкспрессия цитокинов, таких как фактор некроза опухоли  $\alpha$  и интерлейкин 1  $\beta$ , повышенный уровень эндотоксина плазмы, увеличение CD 14 также подавляются бициклолом у алкоголь-интоксцированных мышей. Протективный эффект бициклола при алкоголь-индуцированной гепатотоксичности реализуется преимущественно благодаря его способности уменьшать оксидативный стресс, подавлять экспрессию цитокинов как на уровне белка, так и генов, тормозить активацию клеток Купфера путем уменьшения уровня эндотоксина плазмы и экспрессии CD 14.

© 2008 Elsevier B.V. Все права защищены.

**Ключевые слова:** Бициклол (Bicyclol), Алкоголь, Оксидативный стресс, Эндотоксин, Цитокины.

### 1. Введение.

Алкоголь – одна из основных причин терминальных заболеваний печени во всем мире, а алкогольная болезнь печени – вторая по значимости причина трансплантации печени в Соединенных Штатах (Mandayam et al. 2004). Вследствие увеличения потребления

алкоголя и смены пищевого рациона в сторону увеличения потребления жиров частота возникновения алкогольной болезни печени в Китае увеличилась, превратившись в важный фактор риска заболеваемости и смертности в дополнение к вирусным гепатитам (Zhuang and Zhang, 2003). На сегодня удовлетворительной терапии алкогольной болезни печени, за исключением абстиненции и поддерживающего лечения, нет (Bouneva et al., 2003).

Спектр клинических форм алкогольной болезни печени варьирует от жировой дистрофии и алкогольного гепатита вплоть до фиброза и цирроза печени (Tuma and Sorrell, 2004). Большой прогресс достигнут в понимании механизмов развития алкогольной болезни печени, предполагающий, что комплекс патологических процессов является следствием метаболизма алкоголя в печени с вовлечением клеток различного типа, таких как гепатоциты, клетки Купфера, нейтрофилы, эндотелиальные клетки и печеночные stellate (звездчатые) клетки (Tsukamoto and Lu, 2001).

Существует три известных метаболических энзимных системы, каждая из которых локализована в разных внутриклеточных отделах (компартаментах), которые принимают участие в окислении алкоголя: алкоголь дегидрогеназа (ADH) в цитоплазме, микросомальная этанол-окисляющая система (MEOS) в эндоплазматическом ретикулуме и каталаза в пероксисомах (Lieber and Abittan, 1999; Lieber 1997). Все они приводят к гиперпродукции реактивных форм кислорода, включая супероксиды, пероксиды и гидроксильные радикалы, которые могут вызывать полную деградацию липидов, белков и ДНК (Wu and Cedebbaum, 2003). В дополнение к выработке реактивных форм кислорода воздействие алкоголя также повреждает энзимные и неэнзимные механизмы, защищающие клетки от реактивных форм кислорода, такие как супероксиддисмутаза (SOD), каталаза, глутатион пероксидаза, глутатион редуктаза (GR) и глутатион (GSH) (Wu and Cedebbaum, 2003). Результатом повышенной продукции реактивных форм кислорода и ответной компромиссной антиоксидантной активности становится оксидативный стресс, который, как было показано, играет важную роль в алкоголь-индуцированном повреждении печени (Dey and Cederbaum, 2006; Cederbaum, 2001).

Существенная роль провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли (TNF  $\alpha$ ) и интерлейкина 1 $\beta$  (ИЛ-1 $\beta$ ) было продемонстрировано как в клинических ситуациях, так и в экспериментальных моделях алкогольной болезни печени (McClain et al., 1999; Thurman et al., 1999; Tilg and Diehl, 2000). Клетки Купфера - резидентные макрофаги печени (Wheeler, 2003), по всей вероятности, являются основным источником указанных выше цитокинов при АБП. Было доказано, что эндотоксины активируют клетки Купфера путем связывания с CD14 (Wright et al., 1990), которые распределены исключительно снаружи клеток Купфера, и запускают каскад биохимических сигналов. Накопленные данные демонстрируют то, что воздействие алкоголя приводит к повышению уровня эндотоксинов в крови как вследствие уменьшения его выведения из циркуляции, так и увеличения его всасывания из кишечника (Rivera et al., 2003, Nolan, 1975; Adachi et al., 1994).

Бициклом – оригинальный синтетический гепатопротектор, созданный как средство для лечения хронического гепатита В в Китае (Liu 2001). Бициклом обладает протективным эффектом в экспериментальных моделях повреждения печени, индуцированном различными химическими токсинами, включая CCl<sub>4</sub>, D – галактозамин, конкавалин А и ацетаминофен. Гепатопротекторный механизм Бициклола включает удаление реактивных форм кислорода, регуляцию секреции цитокинов и торможение апоптоза, вызванного иммунологическим повреждением (Liu 2001).

Целью настоящего исследования было выяснить, обладает ли Бициклом протективным эффектом при остром алкоголь-индуцированном повреждении печени, в модели на грызунах, демонстрирующей ранние патологические изменения при АБП и изучить связанные механизмы оксидативного стресса, экспрессии цитокинов и активации клеток Купфера.

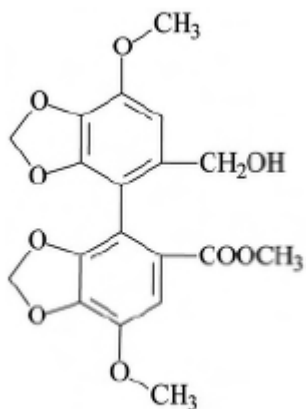


Fig. 1. Chemical structure of bicyclol.

## 2. Материалы и методы.

### Реагенты

Бициклол был любезно предоставлен Beijing Union Pharmaceutical Factory (чистота > 99%). Алкоголь был закуплен у Beijing Qixing Alcohol Co. Ltd, Китай. Наборы для определения Аланинаминотрансферазы (АЛТ) и триглицеридов были получены от ВНКТ Chemical Reagent Co., Ltd, Китай. Наборы для определения супероксиддисмутазы (SOD), каталазы, GR и GSH-пероксидазы были получены от Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute (Китай). Наборы для энзим-связанного иммуносорбентного анализа ELISA были получены от eBioscience (США). Набор для определения эндотоксинов был закуплен у Xiamen Houshiji Ltd, Китай. Кроличьи антитела к мышинному TNF  $\alpha$  и антимышинные CD14 антитела были произведены Boster Biological Technology Ltd, Китай. Тризол был получен у BioDev Tech Co Ltd, Китай. Наборы для проведения цепной полимеразной реакции (RT-PCR) были закуплены у Takara Biotechnology Co., Ltd (Japan). Другие реактивы были аналитического качества и закуплены на отечественном рынке.

### 2.2 Процедура обработки подопытных животных

Самцы мышей ICR весом 22 – 24 г были получены от Beijing Vital River Experimental Animal Co., Ltd. Мыши содержались при температуре 22°C и 12-ти часовом цикле светового дня, имели свободный доступ к кормушке и поилке для грызунов. Все экспериментальные процедуры выполнялись в соответствии с руководством по обращению с животными Китая, которое соответствует международным принципам по уходу и обращению с экспериментальными животными.

В группе, получающей Бициклол, мышам вводился Бициклол в дозе 200, 300мг/кг (в суспензии 5% карбоксиметилцеллюлозы) через желудочный зонд трехкратно два дня подряд; контрольная группа получала аналогичный объем носителя в качестве контроля. Все животные получали перорально алкоголь в дозе 6г/кг через 1 час после последней дозы бициклола за исключением мышей контрольной группы.

Животные забивались в разные промежутки времени, как указано далее. Образцы крови забирались для определения сывороточных уровней АЛТ и эндотоксинов. По два образца ткани печени из аналогичных участков органа забирались у каждого животного, фиксировались соответствующим образом для гистопатологического и иммуногистохимического исследования соответственно. Оставшаяся ткань печени хранилась при температуре -80°C для биохимического анализа, исследования ELISA и выделения RNA.

### 2.3 Содержание сывороточной АЛТ и печеночных триглицеридов.

Уровень АЛТ сыворотки измерялся колорметрически с помощью соответствующего диагностического набора в соответствии с инструкцией.

Ткань печени гомогенизировалась в 9 объемах 0,9% NaCl и содержание печеночных триглицеридов определялось с помощью коммерческих наборов.

#### *2.4 Гистопатологическое исследование*

Ткань печени фиксировалась 10%с нейтральным формалином и заливалась в парапласт. Срезы ткани (5 мкм) окрашивались гематоксилин-эозином.

#### *2.5 Определение липидной пероксидации*

Липидная пероксидация рассчитывалась путем измерения ацидо-реактивной субстанции тиобарбитуровой кислоты как описывалось ранее (Ohkawa et al., 1979). Концентрация ацидо-реактивной субстанции тиобарбитуровой кислоты рассчитывалась с помощью 1,1,5,5-тетраэтоксипропана в качестве стандарта и выражалась в нмоль/мг белка.

#### *2.6 Содержание печеночного глутатиона (GSH)*

Содержание печеночного глутатиона (GSH) производилось как описано Ellmann (Ellmann, 1959). Гомогенат печени (500 мкл) преципитировался добавлением 0,5 мл 4% сульфосалициловой кислоты и центрифугировался при 2858 x г в течение 10 мин. Супернатант (900 мкл) смешивался с 0,004% DNTB (100 мкл). После образования воронки и отстаивания в течение 10 минут при комнатной температуре определялась поглощающая способность смеси при длине волны 412 нм и рассчитывалось содержание GSH с использованием стандартной кривой.

#### *2.7 Приготовление печеночной субцеллюлярной (субклеточной) фракции*

Свежая печеночная ткань промывалась 0,9% NaCl и гомогенизировалась в 3 объемах 10 мМ Трис-Ацетата (pH 7,4), содержащего 0,25мM сахарозы и 0,5мM EDTA при 4°C. После центрифугирования незрелого гомогената при 800xг в течение 10 минут при 4°C для удаления ядерной фракции и клеточных осколков, супернатант центрифугировался при 6500xг при 4°C. Митохондриальная фракция остается в преципитате. Супернатант подвергается дальнейшему центрифугированию при 10000xг в течение 60 минут при 4°C. Микросомальная и цитозольная фракции оставались в преципитате и супернатанте, соответственно. Печеночные субклеточные фракции хранились в прослойке при - 80°C до проведения анализа.

#### *2.9 Определение активности антиоксидантных ферментов*

Цитозольные SOD, каталаза, глутатион-редуктаза и митохондриальная глутатион-пероксидаза измерялись спектрофотометрическим анализом с использованием коммерческих наборов.

#### *2.9 Количественное определение TNF- $\alpha$ и IL-1 $\beta$*

Образцы печени для определения цитокинов подготавливались как описано ранее (Wolf et al., 2001, Zhou et al., 2003). Вкратце, образцы печени были дезинтегрированы в 4 объемах ледяного буфера Ripa (150 мМ NaCl, 5 мМ EDTA, 50 мМ Tris (pH 7,4)), содержащего ингибиторы протеаз (1 мкг/мл аprotинина, 10мкг/мл леупептина и 1 мкг/мл пепстайтн), D-назу (0,05мг/мл) и детергенты (0,3% Тритон X-100, 0,03% натрия додецилсульфат, 0,3% натрия деоксихолат). После инкубации на льду в течение 30 минут образцы

центрифугировались дважды при 20000xg 15 минут при 4°C. Конечный супернатант был собран и хранился при - 80°C до определения интрагепатических цитокинов с помощью набора ELISA. Печеночные лизаты были откорректированы по одинаковой концентрации протеина после количественного определения методом Coomassie blue. Результаты выражались в пг/мг протеина.

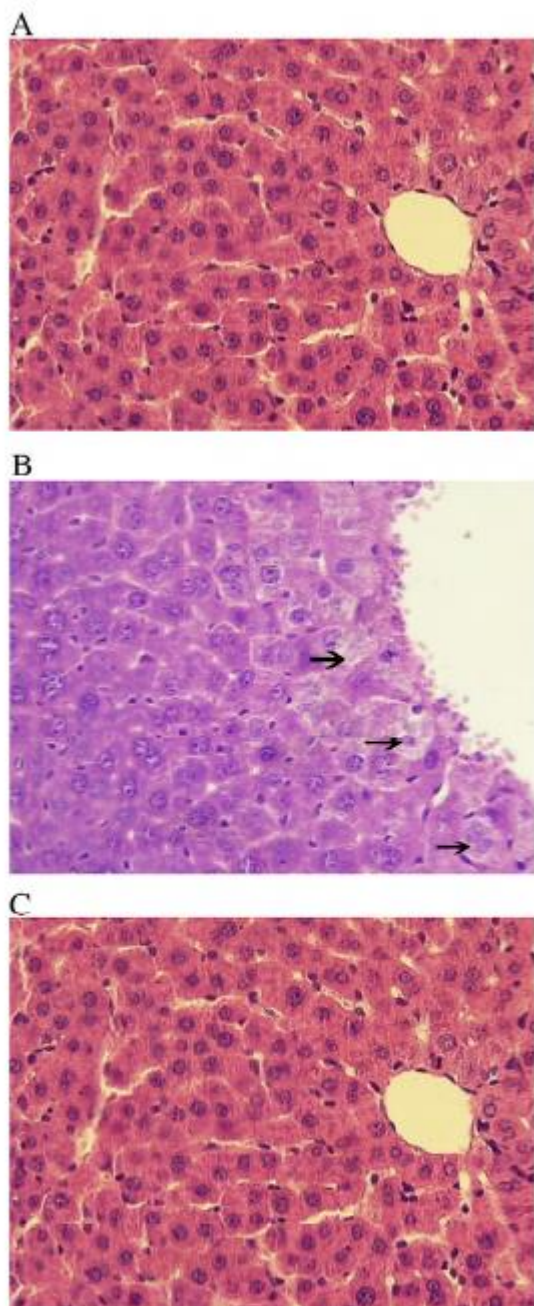


Fig. 2. Effect of bicyclol on liver injury induced by alcohol in mice. Bicyclol (200, 300 mg/kg) was given orally to mice three times before alcohol treatment. Mice were sacrificed at 12 h after alcohol administration. (A) Control; (B) Alcohol; (C) Bicyclol. Alcohol treatment induced swelling and hydropic degeneration of hepatocytes (arrows). Hematoxylin and eosin staining; Original magnification,  $\times 100$ .

### 2.10 Изоляция тотальной печеночной RNA и ПЦР – RT для определения экспрессии mRNA $TNF-\alpha$ и $IL-1\beta$

Тотальная RNA из печеночной ткани изолировалась с использованием реагента Trizol в соответствии с инструкциями производителя. 500 мкг тотальной RNA использовалось для

синтеза CDNA и 10мкл каждого из продуктов реверсивного транскрибирования добавлялись к 40мкл смеси реактивов, содержащей 10мкл 5 x PCR буфера, 0,25 мкл 5УД/мкл Ex Taq DNA полимеразы, 1 мкл 100мкМ соответствующих праймеров и 27,75 мкл ddH<sub>2</sub>O для амплификации ПЦР. Следующие праймеры были синтезированы SBS Genetech: GAPDH, 5'-TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC-3' and 5'-ATT CAT TGT CAT ACC AGG AAA-3'; TNF- $\alpha$ , 5'-GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TTG C-3' and 5'-ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TCG G-3'; IL-1 $\beta$ , 5'-AGC CCA TCC TCT GTG ACT CAT GTC G-3' and 5'-GCT GAT GTA CCA GTT GGG GAA C-3'; The

Размер амплифицированных ПЦР продуктов составлял 652 бп для GAPDH, 307 бп для TNF- $\alpha$  и 420 бп для IL-1 $\beta$ . ПЦР была иницирована при 94°C в течение 2 минут с последующими 23-40 циклами при 94°C в течение 30 с, 50-60°C в течение 30 с и 72°C в течение 1 минуты. Количество циклов и температура отжига для каждой пары праймеров были оптимизированы. Число циклов для GAPDH, TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  составляло 23, 40 и 35 соответственно, в то время как температура отжига была 55°C, 60°C и 56°C. Заключительное удержание при 72°C в течение 10 минут было включено. Амплифицированные продукты ПЦР были подвергнуты электрофорезу при 100 V через 1,5% гель агарозы в течение 40 минут. Лесенка 100bp DNA была использована в качестве молекулярного маркера. Полоски визуализировались с этидия бромидом и анализировались с помощью BandScan.

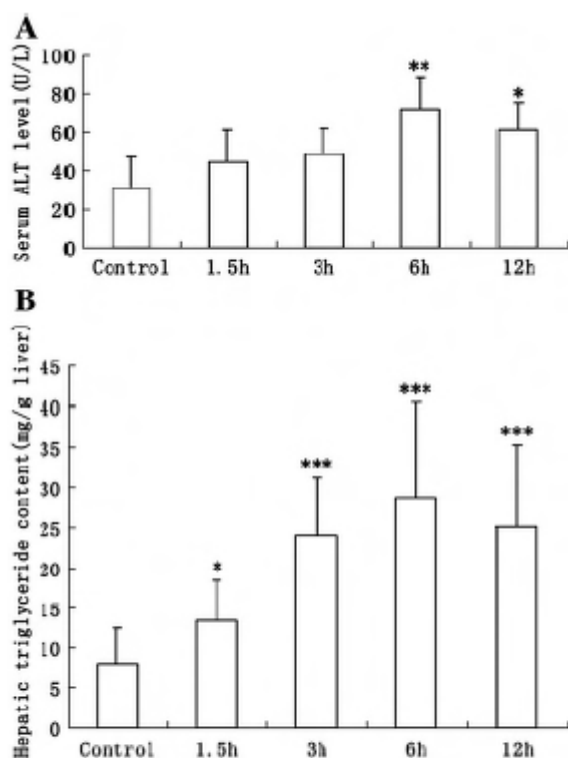


Fig. 3. Time-course changes of serum ALT and hepatic triglyceride in acute alcohol-intoxicated mice. Alcohol (6 g/kg) was administered to mice by gavage. The animals were sacrificed at 1.5, 3, 6, and 12 h after alcohol administration. Data were expressed as means $\pm$ SD ( $n=8$ ). \*,  $P<0.05$ , \*\*,  $P<0.01$ , \*\*\*,  $P<0.001$  vs. control group.

## 2.11 Определение уровня эндотоксинов плазмы.

Уровень эндотоксинов плазмы определялся с помощью набора для количественного хромогенного определения эндотоксина лизата амебоцита тахифлеус в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, образцы плазмы разводились 1: 10 водно – Трис HCl буферным раствором и нагревались при 70°C для денатурации эндогенных ингибиторов эндотоксина. После центрифугирования при 1270 xg в течение 10 минут супернатант удалялся и инкубировался с лизатом лимулул амебицитом при 37°C в течение 10 минут, затем инкубировался с приложенной хромогенной субстанцией в течение 6 минут. Абсорбция при длине волны 545нм измерялась после добавления соответствующих азореагентов.

## 2.12. Иммуногистохимическая локализация печеночного TNF- $\alpha$ и CD 14

Фиксированные формалином, залитые парафином срезы (10 мкм) были помещены на стеклянные слайды. Срезы депарафинизировались, инкубировались в 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 10 минут для подавления активности эндогенной пероксидазы. После блокировки с нормальной козлиной сывороткой в течение 20 минут срезы окрашивались поликлональными кроличьими анти - TNF- $\alpha$  и анти CD 14 антителами при 4°C всю ночь, соответственно, с последующей инкубацией с пероксидазо-конъюгированными козлиными антикроличьими антителами при 37 °C в течение 30 минут. Участки, связывающие антитела визуализировались путем инкубации с DAB – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при комнатной температуре в течение 10 минут.

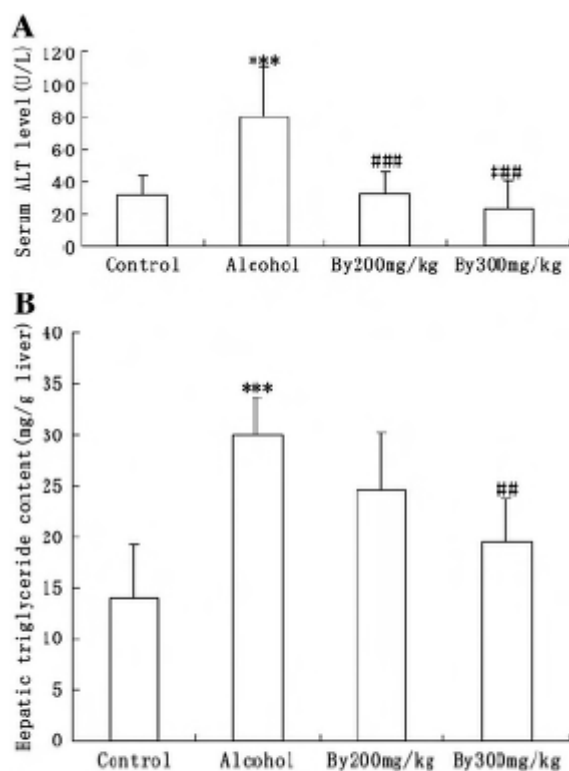


Fig. 4. Effect of bicyclol on the elevation of serum ALT and hepatic triglyceride levels in acute alcohol-intoxicated mice. Bicyclol (200, 300 mg/kg) was given orally to mice three times before alcohol treatment. Mice were sacrificed at 6 h after alcohol administration. Data were expressed as means $\pm$ SD ( $n=8$ ). \*\*\*,  $P<0.001$  vs. control group; ##,  $P<0.01$ , ####,  $P<0.001$  vs. alcohol group.

### 2.13. Статистический анализ

Все данные выражались как среднее  $\pm$  SD (стандартное отклонение). Статистический анализ проводился с использованием ANOVA и теста Student-Newmann-Keuls post hoc. Различия между группами считались статистически достоверными при  $P < 0,05$ .

## 3. Результаты.

### 3.1. Влияние Бициклола на острое повреждение печени, индуцированное алкоголем.

Острое алкоголь-индуцированное повреждение печени характеризуется повышением сывороточного уровня АЛТ, печеночных триглицеридов и патоморфологическими изменениями печеночной ткани в виде набухания и гидропической дегенерации гепатоцитов вокруг центральных и междольковых вен. Превентивное назначение подопытным мышам бициклола существенно уменьшало степень указанных гистопатологических изменений (рис. 2). Сывороточный уровень АЛТ и печеночных триглицеридов возрастал в 2,3 и 3,5 раз, соответственно, по сравнению с показателями нормальных мышей на 6-м часу после назначения алкоголя (рис. 3). Предварительное назначение Бициклола существенно редуцировало повышение АЛТ и накопление печеночных триглицеридов по дозозависимому типу (рис. 4).

### 3.2. Влияние Бициклола на печеночную липидную пероксидацию, индуцированную алкоголем.

Липидная пероксидация определялась путем измерения содержания реактивной субстанции тиобарбитуровой кислоты. Содержание реактивной субстанции тиобарбитуровой кислоты в печени повышалось через 6 часов после введения алкоголя и достигало 2,7-кратного по сравнению с контролем на 12-м часу (рис. 5). Предварительное назначение Бициклола достоверно уменьшает алкоголь-индуцированное повышение реактивной субстанции тиобарбитуровой кислоты в печени на 32% (рис. 6).

### 3.3. Влияние Бициклола на истощение печеночного глутатиона (GSH), индуцированную алкоголем.

Как показано на рис. 5, содержание печеночного глутатиона уменьшается уже через 1,5 ч после введения алкоголя, а через 6 часов определяется лишь 40% контрольных значений. Назначение Бициклола (300 мг/кг) защищает от алкоголь-индуцированного истощения глутатиона, о чем свидетельствует возвращение показателя к нормальным значениям (рис. 6).



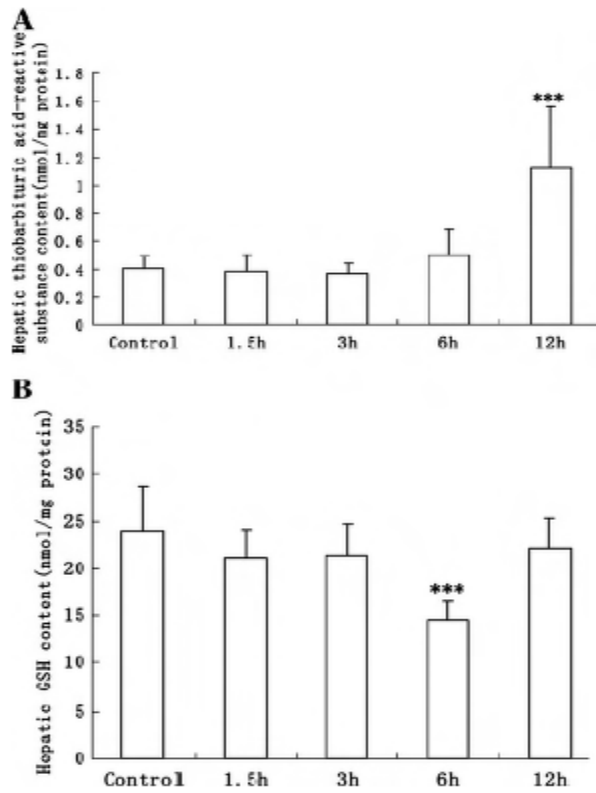


Fig. 5. Time-course changes of hepatic lipid peroxidation and GSH content in acute alcohol-intoxicated mice. Alcohol (6 g/kg) was administered to mice by gavage. The animals were sacrificed at 1.5, 3, 6, and 12 h after alcohol administration. Data were expressed as means±SD ( $n=8$ ). \*\*\*,  $P<0.001$  vs. control group.

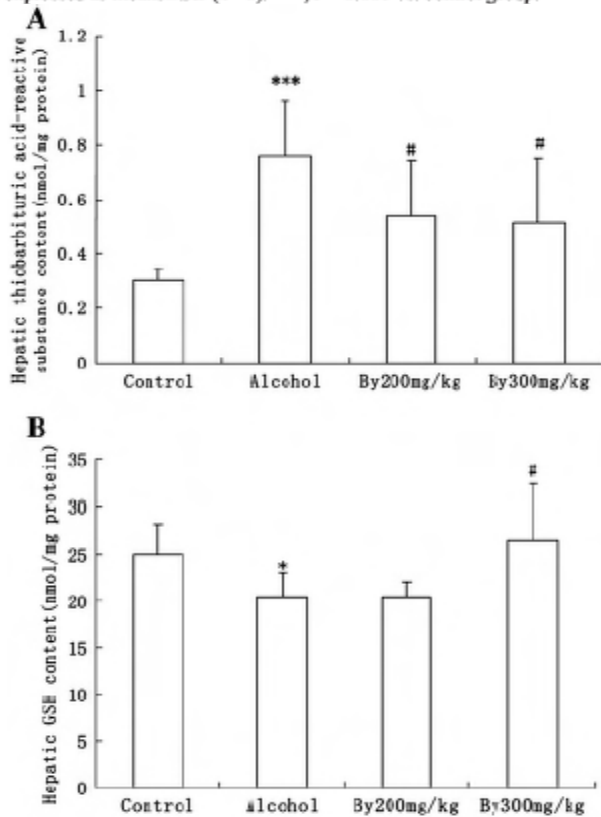


Fig. 6. Effect of bicyclol on hepatic lipid peroxidation and GSH depletion in acute alcohol-intoxicated mice. Bicyclol (200, 300 mg/kg) was given orally to mice three times before alcohol treatment. Mice were sacrificed at 12 h and 6 h after alcohol administration for thiobarbituric acid-reactive substance and GSH content determination respectively. Data were expressed as means±SD ( $n=8$ ). \*,  $P<0.05$ , \*\*\*,  $P<0.001$  vs. control group; #,  $P<0.05$  vs. alcohol group.

### 3.4. Влияние Бициклола на активность антиоксидантных ферментов у алкоголь-интоксцированных мышей.

Наблюдались заметные изменения в содержании печеночной супероксиддисмутазы (SOD), каталазы, глутатион-редуктазы (GR) и глутатион-пероксидазы (GSH-пероксидазы), что выразалось уменьшением ферментативной активности (35%, 18%, 49% и 45% соответственно) через 1,5 ч после введения алкоголя. Предварительное введение Бициклола достоверно дозозависимо ингибирует уменьшение активности SOD и GSH-пероксидазы. Вдобавок, высокие дозы Бициклола (300мг/кг) демонстрируют протективный эффект в отношении алкоголь-индуцированного уменьшения активности каталазы, хотя и без достоверной разницы в сравнении с группой, получавшей алкоголь. Бициклол также демонстрирует протективный эффект в отношении уменьшения активности GR, хотя достоверная разница наблюдалась только в группе, получавшей Бициклол (300 мг/кг) (таб.1).

Table 1  
Effect of bicyclol on SOD, catalase, GR and GSH-peroxidase activity in acute alcohol-intoxicated mice

Group	SOD (U/mg protein)	Catalase (U/mg protein)	GR (U/g protein)	GSH-peroxidase (U/mg protein)
Control	223.78±29.27	8.77±0.89	4.78±1.79	2.98±0.52
Alcohol	143.90±25.53 <sup>b</sup>	7.14±0.68 <sup>a</sup>	2.43±0.94 <sup>a</sup>	1.62±0.09 <sup>b</sup>
By 200 mg/kg	210.48±40.68 <sup>c</sup>	6.90±0.34	3.72±1.34	3.81±0.49 <sup>d</sup>
By 300 mg/kg	223.40±39.22 <sup>d</sup>	7.59±1.1	3.98±0.72 <sup>c</sup>	4.52±1.06 <sup>d</sup>

Bicyclol (200, 300 mg/kg) was given orally to mice three times before alcohol treatment. Mice were sacrificed at 1.5 h after alcohol administration. a,  $P<0.05$ , b,  $P<0.001$  vs. control group; c,  $P<0.05$ , d,  $P<0.001$  vs. alcohol group.

### 3.5. Влияние Бициклола на экспрессию печеночного TNF- $\alpha$ и IL-1 $\beta$ у алкоголь-интоксцированных мышей.

Сверхэкспрессия печеночных TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$ , индуцированная введением алкоголя оценивалась определением как протеинов, так генов, с помощью иммуноферментного анализа (ELISA) и ПЦР – RT, соответственно. Полученные результаты продемонстрировали, что уровень печеночных TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  были повышены через 1,5 часа после введения алкоголя и достигали пика на 12-м часу, превышая контрольные уровни примерно в 2,4 – 1,7 раза (рис. 7).

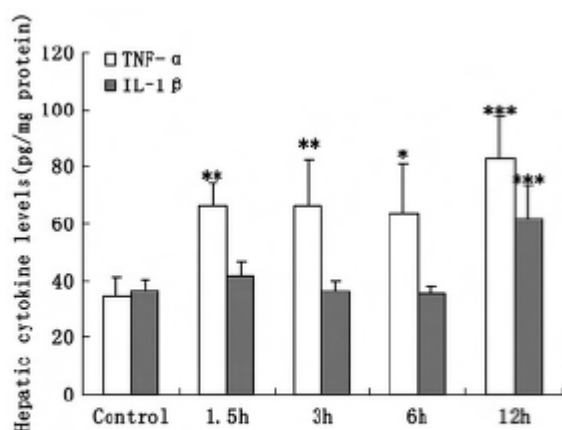


Fig. 7. Time-course changes of hepatic TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in acute alcohol-intoxicated mice. Alcohol (6 g/kg) was administered to mice by gavage. The animals were sacrificed at 1.5, 3, 6, and 12 h after alcohol administration. Data were expressed as means±SD (n=8). \*,  $P<0.05$ , \*\*,  $P<0.01$ , \*\*\*,  $P<0.001$  vs. control group.

Бициклол достоверно дозозависимо уменьшает продукцию печеночных TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  (рис. 8).

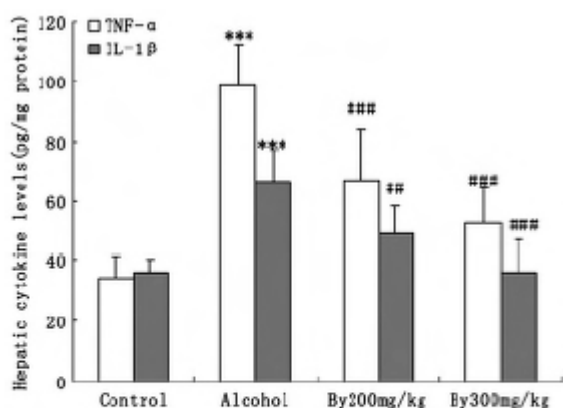


Fig. 8. Effect of bicyclol on hepatic TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in acute alcohol-intoxicated mice. Bicyclol (200, 300 mg/kg) was given orally to mice three times before alcohol treatment. Mice were sacrificed at 12 h after alcohol administration. Data were expressed as means  $\pm$  SD ( $n=8$ ). \*\*\*,  $P<0.001$  vs. control group; ##,  $P<0.01$ , ###,  $P<0.001$  vs. alcohol group.

Экспрессия mRNA TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  повышалась в 2 – 2,4 раза после назначения алкоголя, и бициклол также существенно ингибировал эти изменения (рис. 9). Локализация TNF- $\alpha$  дополнительно визуализировалась иммуногистохимически. Как показано на рис. 12, TNF- $\alpha$ -позитивными клетками были преимущественно клетки Купфера, локализованные в стенках синусоидов. Предварительное введение Бициклола (300мг/кг) может уменьшать экспрессию TNF- $\alpha$  клетками Купфера, что согласуется с результатами ИФА (ELISA) и ПЦР – RT.

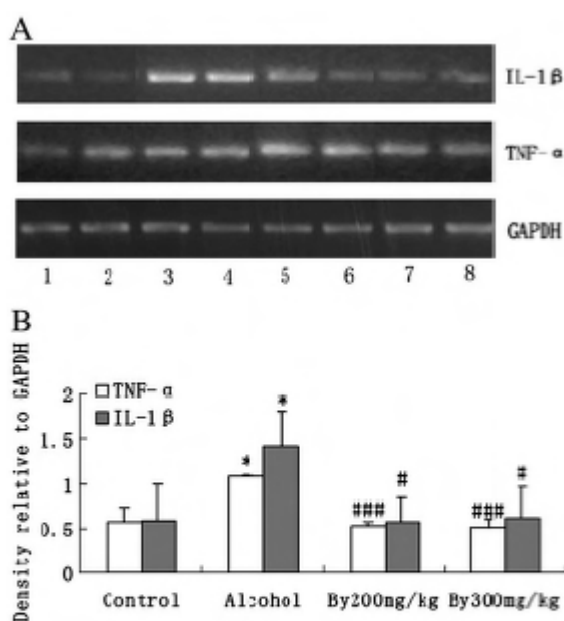


Fig. 9. Effects of bicyclol on hepatic TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA expression in acute alcohol-intoxicated mice. Bicyclol (200, 300 mg/kg) was given orally to mice three times before alcohol treatment. Mice were sacrificed at 12 h after alcohol administration. (A): lane 1–2, Control; lane 3–4, Alcohol; lane 5–6, By 200 mg/kg; lane 7–8, By 300 mg/kg. (B): Ratio of PCR products relative to GAPDH. Data were expressed as means  $\pm$  SD ( $n=4$ ). \*,  $P<0.05$  vs. control group; #,  $P<0.05$ , ###,  $P<0.001$  vs. alcohol group.

### 3.6. Влияние Бициклола на повышение уровня эндотоксина плазмы у алкоголь-интоксцированных мышей.

Эндотоксин – важный фактор, который является триггером для продукции TNF- $\alpha$  при алкоголь-индуцированном поражении печени. Было обнаружено, что уровень эндотоксина

плазмы существенно возрастает через 1,5 ч и снижается до нормы через 6 ч после употребления алкоголя (рис. 10). Предварительное введение Бициклола (200, 300мг/кг) достоверно ингибирует повышение уровня эндотоксина плазмы на 79% и 60% соответственно (рис. 11).

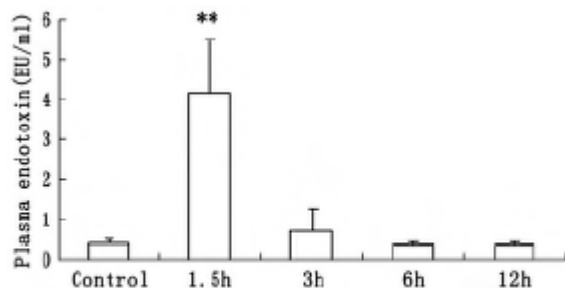


Fig. 10. Time-course changes in plasma endotoxin level in acute alcohol-intoxicated mice. Alcohol (6 g/kg) was administered to mice by gavage. The animals were sacrificed at 1.5, 3, 6, and 12 h after alcohol administration. Data were expressed as means±SD (n=6). \*\*,  $P < 0.01$  vs. control group.

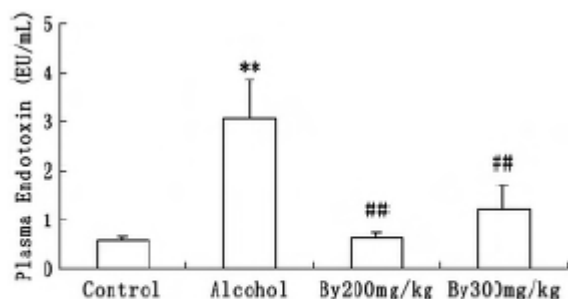


Fig.11. Effect of bicyclol on plasma endotoxin level in acute alcohol-intoxicated mice. Bicyclol (200, 300 mg/kg) was given orally to mice three times before alcohol treatment. Mice were sacrificed at 1.5 h after alcohol administration. Data were expressed as means±SD (n=6). \*\*,  $P < 0.01$  vs. control group; ##,  $P < 0.01$  vs. alcohol group.

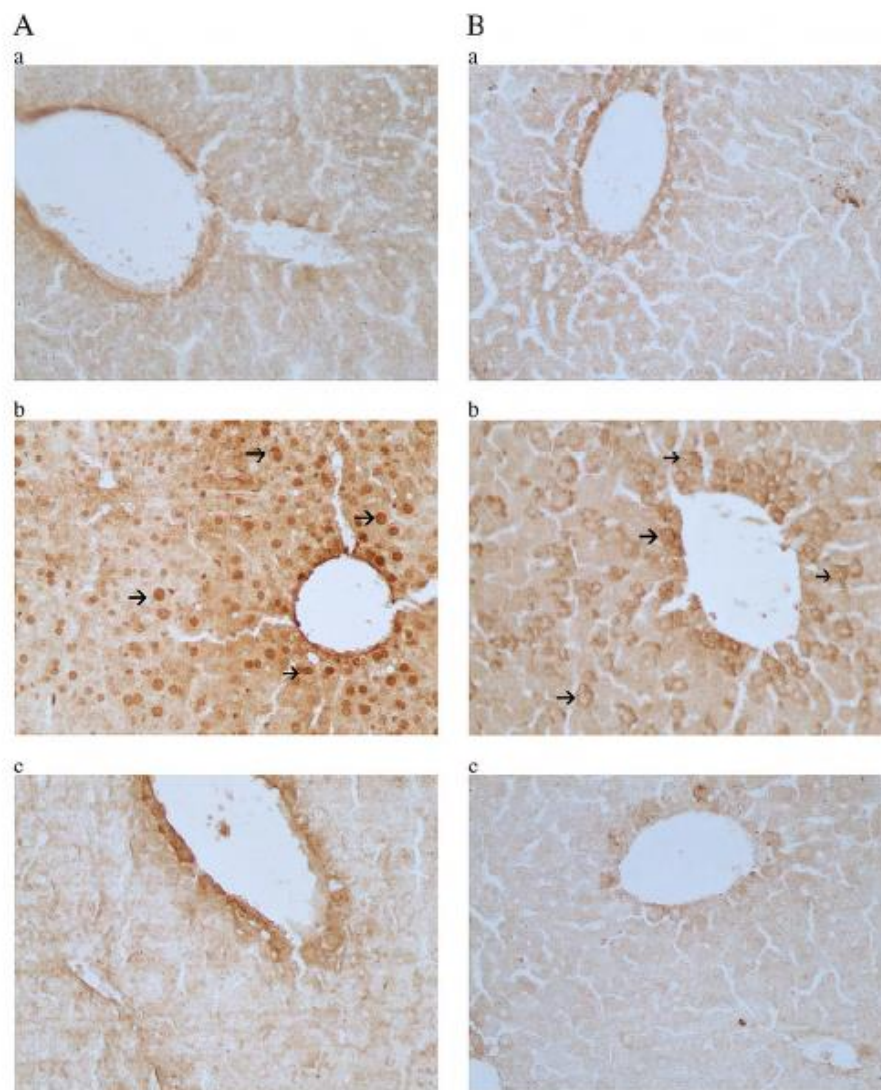


Fig. 12. Localization of liver TNF- $\alpha$  and CD14 expression in acute alcohol-intoxicated mice. Bicyclol (200, 300 mg/kg) was given orally to mice ( $n=5$ ) three times before alcohol treatment. Mice were sacrificed at 12 h after alcohol administration. 1: expression of TNF- $\alpha$ ; 2: expression of CD14. a: Control; b: Alcohol; c: Pretreatment with Bicyclol. Arrows: Positive cells. Original magnification  $\times 100$ .

### 3.7. Влияние Бициклола на алкоголь-индуцированную экспрессию CD 14.

Печеночная экспрессия CD 14 определялась через 12 ч после назначения алкоголя иммуногистохимическим окрашиванием. Как показано на рис. 12, алкоголь приводит к массивной индукции CD 14, которые преимущественно распределены на клетках Купфера, по сравнению с контрольной группой. Назначение Бициклола (300 мг/кг) редуцирует иммунореактивность CD 14, предположительно путем торможения воздействия алкоголя на этот процесс.

## 4. Обсуждение.

Результаты настоящего исследования продемонстрировали, что острое воздействие алкоголя вызывает повреждение печени, подтверждением чему служит повышение сывороточной АЛТ и печеночных триглицеридов, набухание и гидропическая дегенерация гепатоцитов, что отражает ранние биохимические и патологические изменения при алкогольной болезни печени. Превентивное назначение Бициклола обеспечивает существенную защиту у алкоголь-интоксцированных мышей, снижая повышение АЛТ и уменьшение накопления триглицеридов по дозозависимому типу.

Гистопатологические изменения, индуцированные алкоголем, также существенно уменьшались под воздействием Бициклола.

Роль оксидативного стресса в развитии алкогольной болезни печени была заподозрена еще в 1960-х гг Diluzio (1964) и Diluzio Hartman (1967), которые обнаружили, что назначение алкоголя вызывает оксидативный пробой клеточных мембран. Исследования с использованием модели интрагастрального введения продемонстрировали, что алкоголь-индуцированное повреждение печени ассоциируется с повышенной липидной пероксидацией, формированием протеин карбонил, 1 –гидрокил этильных и липидных радикалов и снижением печеночной антиоксидантной защиты, представляя наиболее убедительные доказательства патогенетической роли оксидативного стресса (Rouach et al., 1997; French et al., 1993; Polavarapu et al., 1998; Knecht et al., 1995; Nanji et al., 1994).

Наши результаты подтвердили вовлечение оксидативного стресса в острое алкоголь-индуцированное повреждение печени и продемонстрировало достоверный протективный эффект Бициклола, о чем свидетельствует уменьшение липидной пероксидации. Более того, как скомпрометированный неэнзимный антиоксидант глутатион (GSH), так и энзимные антиоксиданты, включая супероксиддисмутазу (SOD), каталазу, GR и GSH-пероксидазу, также восстанавливаются под воздействием Бициклола. В дополнение к предыдущему отчету касательно способности Бициклола связывать свободные радикалы, возникающие под воздействием CCl<sub>4</sub> (Liu et al., 2005) можно заключить, что ослабление острого алкоголь-индуцированного стресса Бициклолом осуществляется благодаря его способности восстанавливать баланс между образованием и разрушением реактивных форм кислорода.

В дополнение к оксидативному повреждению, одним из значительных факторов развития алкогольной болезни печени является усиленный метаболизм цитокинов (Mc. Clain et al., 2004). Было обнаружено, что экспрессия TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  усиливается как в моделях на животных, так и у пациентов с алкогольной болезнью печени (Mc. Clain et al., 1997). В частности, критическая роль TNF- $\alpha$  при алкогольной болезни печени была продемонстрирована у TNFR1-дефицитных мышей, которые не были подвержены алкоголь-индуцированному повреждению печени в отличие от дикого типа мышей (Yin et al., 1999). Более того, было продемонстрировано, что нейтрализация TNF- $\alpha$  специфическими антителами аттенуирует (ослабляет) некроз и воспаление в ткани печени, вызванные воздействием алкоголя (Iimuro et al., 1997). В настоящем исследовании предварительное введение Бициклола существенно уменьшало алкоголь-индуцированную экспрессию TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  как на уровне белка, так и генов. Иммуногистохимическое окрашивание на TNF- $\alpha$  продемонстрировало, что он локализован на мембранах клеток Купфера, что подтверждает данные предыдущих исследований (Zhou et al., 2003). Бициклол уменьшает количество позитивно-окрашенных клеток, тем самым подтверждая его воздействие на алкоголь-индуцированную экспрессию TNF- $\alpha$ . Во многих отчетах упоминается о том, что алкоголь-индуцированные реактивные формы кислорода могут активировать редокс-чувствительный нуклеарный фактор (NF) – $\kappa$ B, который, в свою очередь, приводит к экспрессии TNF- $\alpha$  (Kono et al., 2000 a,b; Wheeler et al., 2001 a,b; Yin et al., 1999). Кроме того, многочисленные исследования продемонстрировали, что лечение антиоксидантами, такими как аллопуринол, эбселен, дифенилэнеидониум сульфат, ослабляет активацию (NF) – $\kappa$ B и экспрессию TNF- $\alpha$  (Kono et al., 2000 a,b; 2001 a,b). Следовательно, мы смогли выдвинуть гипотезу о том, что ингибирующий эффект Бициклола на экспрессию TNF- $\alpha$  по крайней мере частично обусловлен его антиоксидантными свойствами.

На сегодня является общепризнанным, что активированные клетки Купфера ответственны за продукцию провоспалительных цитокинов. Бактериальные эндотоксины – одна из субстанций, эффективно активирующих клетки Купфера и играющих критическую роль в алкогольной болезни печени. Было описано, что уровень циркулирующего эндотоксина повышен у пациентов с алкогольной болезнью печени (Fukui et al., 1991) и в экспериментальных моделях алкогольной болезни печени (Nishiyama et al., 2002; Adachi et al., 1995; Nanji et al., 1997), в то время как элиминация эндотоксина из кишечника с помощью

антибиотиков может полностью предупредить алкоголь-индуцированное поражение печени. В настоящем исследовании нами было обнаружено, что уровень эндотоксина плазмы увеличивается под воздействием алкоголя, что коррелирует с данными предыдущего исследования. Превентивное назначение Бициклола эффективно подавляет повышение уровня эндотоксина, что может быть связано с влиянием Бициклола на повышенную кишечную проницаемость, индуцированную алкоголем. Основным механизмом нуждается в дальнейшем изучении. Уменьшенный уровень эндотоксина плазмы может приводить к угнетению активации клеток Купфера, чем, следовательно, и объясняется подавление экспрессии провоспалительных цитокинов под воздействием Бициклола.

CD14 играют ключевую роль в активации клеток Купфера эндотоксином, что было продемонстрировано в многочисленных исследованиях (Wright et al., 1990; Ferrero et al., 1993; Haziot et al., 1996). Мы изучали экспрессию печеночных CD14 иммуногистохимически. Результаты продемонстрировали, что рецепторы к CD14, локализованные на клетках Купфера, активизируются под воздействием алкоголя. Бициклол способен ослаблять позитивное окрашивание CD14, предположительно, Бициклол может предупреждать активацию клеток Купфера, влияя на их сигнальную трансдукцию в дополнение к уменьшению его лигандного эндотоксина. Более того, антиоксидантные свойства Бициклола могут вносить свой вклад в снижение экспрессии CD14, было показано, что алкоголь-индуцированное повышение CD14 вовлекает оксидант-зависимый AP-1 путь (Wheeler and Thurman, 2003).

В заключение следует отметить, что Бициклол демонстрирует выраженный протективный эффект при алкоголь-индуцированном повреждении печени. Гепатопротекторное действие Бициклола наиболее вероятно, обусловлено его способностью ослаблять оксидативный стресс, подавлять экспрессию цитокинов как на белковом, так и генном уровнях, тормозить активацию клеток Купфера путем уменьшения уровня эндотоксина плазмы и экспрессии CD14.

#### **Выражение признательности.**

Представленная работа была проведена при поддержке программы Китая по поддержке фундаментальных исследований (National Grand Fundamental Research 973), номер гранта 2004CB518908. Мы выражаем благодарность профессорам Naikung Zhao и Lanfang Zhou за помощь в проведении гистопатологического и иммунохимического исследований.