



ГЕПАТОПРОТЕКТИВНЫЙ ЭФФЕКТ БИЦИКЛОЛА ПРИ ТЕТРАЦИКЛИН-ИНДУЦИРОВАННОМ СТЕАТОЗЕ У МЫШЕЙ

Hong-Yan Yu, Bao-Lian Wang, Jing Zhao, Xiao-Min Yao, Yu Gu, Yan Li*

Департамент разработки новых лекарственных средств, институт Материя Медика, академия медицинских наук Китая, Пекин, 100050, Китай

Абстракт

Альфа рецепторы, активирующие пролиферацию пероксисом (PPAR α) и оксидантный стресс являются важными патологическими факторами в развитии неалкогольного стеатогепатита (NASH). Частично тетрациклин-индуцированный стеатогепатит развивается при повреждении митохондриальных жирных кислот вследствие β -окисления, регулируемого PPAR α . Бициклом является инновационным препаратом, специально разработанным для лечения стеатогепатита, одним из основных механизмов действия которого является регулирование активности PPAR α и выведение из организма реактивных форм кислорода (ROS). Настоящее исследование проведено с целью детального исследования гепатопротективных эффектов Бициклола при тетрациклин-индуцированном стеатогепатите у мышей. Бициклом (75, 150, 300 mg/kg) вводился per os мышам три раза, в течение двух дней. Тетрациклин (200 mg/kg) вводился интраперитонеально, спустя 1 час после последнего назначения Бициклола. Оксидативный стресс, функция митохондрий, PPAR α и его гены-мишени оценивались путем биохимических анализов и PCR в реальном времени (RT-PCR). Активность изофермента CYP4A оценивалась посредством метода жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (LC/MS). Бициклом обладает выраженными протекторными свойствами относительно тетрациклин-индуцированного стеатогепатита у мышей, уменьшает аккумуляцию липидов печени, снижает уровни сывороточных аминотрансфераз. Кроме того, Бициклом заметно снижает гиперпродукцию реактивных субстратов тиобарбитуровой кислоты. Сниженная активность комплексов I, IV дыхательной цепи митохондрий (MRC) и митохондриальная неспецифическая проницаемость (MPT) улучшились вследствие применения Бициклола. Более того, Бициклом устранял уменьшение экспрессии PPAR α и его генов-мишеней, включая длинноцепочечную ацил-КоА дегидрогеназу (LCAD), ацетил КоА оксидазу (АОХ) и CYP4A на mRNA, повышая уровень активности ферментов. Бициклом защищает печень при тетрациклин-индуцированном стеатогепатите в основном посредством регулирования нарушений сигнального ядерного PPAR α пути и улучшения функции митохондрий.

Ключевые слова: NASH, PPAR α , митохондриальная дисфункция, Бициклом, тетрациклин

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Введение

Неалкогольный стеатогепатит (NASH) становится глобальной проблемой здоровья, как взрослых, так и детей. У небольшого числа пациентов с NASH наблюдалось прогрессирование заболевания с развитием цирроза, печеночной недостаточности и, иногда, гепатоцеллюлярной карциномы (Adams et al., 2005). Хотя патогенез стеатоза печени является мультифакторным, нарушение окисления жирных кислот

* Corresponding author. Tel.: +86 1063165172; fax: +86 1063017757.
E-mail address: yanli@imm.ac.cn (Y. Li).

(Chitturi and Farrell, 2001; Yu et al., 2003; George and Liddle, 2008) и оксидативный стресс (Yu et al., 2003; Cave et al., 2007) рассматриваются как важные факторы развития этого состояния. Ранее докладывалось, что тетрациклин является одним из лекарственных средств вызывающих стеатогепатит. Биохимические механизмы, вовлеченные в развитие тетрациклин-индуцированного микровезикулярного стеатоза, следующие: (1) β -окисление митохондриальных жирных кислот (Letteron et al., 1996); (2) ингибирование секреции липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) (Labbe et al., 1991) вследствие торможения активности трансферных протеинов микросомальных триглицеридов (Letteron et al., 2003). Однако, до конца, механизм нарушения митохондриального β -окисления остается не выясненным. Так как функционирование PPAR α всегда тесно связывалось с окислением жирных кислот в печени (Ip et al., 2003; Seo et al., 2008), было бы интересным определить роль PPAR α в развитии тетрациклин-индуцированного стеатогепатита. Бициклол (4,4'-диметокси-5, 6, 5', 6'-бис (диметилен-диокси)-2-гидроксиметил-2'-метокси карбонил бифенил), см. Fig. 1., новый синтетический анти-гепатитный препарат, разработанный в Китае для лечения хронических вирусных гепатитов В (Liu, 2001).

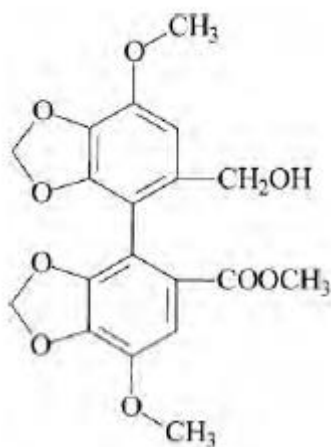


Fig. 1. Химическая структура Бициклола.

Доклинические исследования показали, что Бициклол обладает выраженным протекторным эффектом в отношении экспериментальных моделей повреждения печени различными химическими токсинами и алкоголем. Гепатопротекторный механизм Бициклола частично связан со способностью связывать и выводить из организма реактивные формы кислорода (ROS) (Liu et al., 2005; Zhao et al., 2008). К тому же, неопубликованные данные, полученные в нашей лаборатории, показывают способность Бициклола регулировать экспрессию PPAR α на mRNA у мышей на диете с высоким содержанием жиров.

Поэтому, целью настоящего исследования являлось дальнейшее изучение протективных свойств Бициклола и базисных механизмов сигнального PPAR α пути, в условиях лабораторной модели NASH у мышей, вызванного стеатогенным агентом (тетрациклин).

2. Материалы и методы

2.1 Реагенты

Бициклол был предоставлен Пекинской объединенной фармацевтической фабрикой (BUPF), беспреимность препарата 99%. Тетрациклин и натрий какодилат были приобретены у компании Amresco, Inc.

Наборы для лабораторных анализов на определение аланинаминотрансферазы (ALT), аспаргатаминотрансферазы (AST), печеночных триглицеридов и холестерина получены от ВНКТ Chemical Reagent Co., Ltd. (Китай). Наборы для определения свободных жирных кислот (FFA) и супероксиддисмутаза (SOD) получены от Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute (Китай). Реагент Тризол был приобретен у BioDev Tech Co., Ltd. (Китай). Наборы для постановки PCR в режиме реального времени (RT-PCR) были приобретены у Takara Biotechnology Co., Ltd. (Япония). Родамин 123, пальмитоил-КоА, оксалоацетат, аденозиндифосфат (ADP), ротенон, антимицин А, убиквинон-1, 20-гидроксиэйкозатриеновые кислоты (20-НЕТЕ), арахидоновая кислота, цитохром С, восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида (NADH) и никотинамидадениндинуклеотид (NAD) являлись

продуктами Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Другие химические вещества, не представляющие аналитической ценности, приобретались по месту проведения исследования.

2.2 Лабораторные животные

Использовались мыши лабораторной линии ICR (Vital River Experimental Animal Co., Ltd., Пекин, Китай), мужские особи, весом 20-22 грамма, которые содержались в помещениях с контролем температуры и влажности, 12 часовым циклом день/ночь и неограниченным режимом питания и питья. Все проводившиеся процедуры на животных соответствовали предписаниям Китайского руководства по уходу за лабораторными животными, в соответствии с международными принципами по уходу и использованию экспериментальных животных.

Из предыдущих фармакодинамических исследований известно, что эффективная доза Бициклола колеблется от 75 до 300 mg/kg (Liu et al., 2005; Zhao et al., 2008), поэтому в настоящем исследовании были выбраны дозы 75, 150, 300 mg/kg. В группе получающей Бициклол, мышам вводили разведенный препарат per os, через зонд в дозировке 75, 150, 300 mg/kg (исключая 0,5% содержащейся карбоксиметилцеллюлозы), три раза в течение 2 дней, в других группах животные получали чистый физраствор в том же объеме, для контроля. Всем животным основной группы, спустя 1 час после последней дозы Бициклола, интраперитонеально вводили тетрациклин (разведенный в физрастворе) 200 mg/kg, в группе контроля также вводили тетрациклин в физрастворе, в аналогичной дозе. Животных декапитировали в различное время, через 12 часов после приема пищи. Образцы крови были собраны для определения уровней сывороточных аминотрансфераз. Образцы печеночной ткани быстро иссекались и сохранялись в 10% растворе формальдегида для последующего гистологического исследования. Другие образцы ткани печени использовались для выделения митохондрий, микросом и пероксисом. Остаток тканей был заморожен в жидком азоте и хранился при температуре -70°C до последующего использования.

2.3 Определение липидов печени, степени липидной пероксидации, глутатиона (GSH), активности супероксиддисмутазы (SOD) и уровней сывороточных аминотрансфераз

Уровни ALT и AST в сыворотке крови, содержание триглицеридов и холестерина в печеночной ткани, а так же активность SOD определялись методом спектрофотометрии, с использованием коммерческих наборов для проведения химического анализа.

Степень пероксидации липидов определялась путем измерения содержания реактивных субстратов тиобарбитуровой кислоты, как упоминалось выше (Ohkawa et al., 1979). Содержание глутатиона (GSN) определялось по описанному Ellman (1959) способу.

2.4 Гистологическое исследование

Образцы ткани печени фиксировались в 10% растворе формальдегида и окрашивались гематоксином и эозином (H&E) для морфологического исследования.

2.5 Приготовление субклеточных фракций

Свежие образцы ткани печени, отмытые в 0,9% растворе NaCl, были гомогенизированы в трех объемах (w/v) 10 mM Tris-acetate геля (pH 7,4), содержащего 0,25 M сахарозы и 0,5 M EDTA. Для удаления ядерных фракций и клеточных частиц, гомогенат был отцентрифугирован (800 x g) в течение 10 минут. Супернатант был отцентрифугирован (6500 x g) в течение 20 минут, в осадке получена митохондриальная фракция. Для получения микросомальной фракции, Супернатант подвергался дальнейшему центрифугированию (10000 x g) в течение 60 минут. Весь процесс выполнялся при температуре 4°C .

Пероксисомы были отделены путем центрифугирования в градиенте плотности (Appelkvist et al., 1981). Вкратце, образцы печеночной ткани были гомогенизированы в трех объемах (w/v) раствора, содержащего 0,25 M сахарозы и 0,001 M EDTA, при температуре 4°C . После центрифугирования (2800 x g) в течение 15 минут. Затем 1M глутаральдегида в какодилатном буфере (50 mM, pH 7,4) был добавлен в супернатант и выдержан в течение 30 минут, в холодной ванне, для стабилизации пероксисомальных мембран. Супернатант был расслоен между 6 мл (1,75 M) и 2 мл (2,1 M) раствора сахарозы и затем отцентрифугирован в VTi роторе (160000 x g) в течение 60 минут. Фракция пероксисом была получена между слоями сахарозы 1,75 M и 2,1 M.

Для оценки активности ацетил КоА дегидрогеназы (ACD) и митохондриальной неспецифической проницаемости (MPT) использовались свежие митохондрии. Другие субклеточные фракции хранились при температуре -70°C до момента проведения химических анализов.

2.6 Измерение активности ферментов

Активность ACD (Osmundsen, 1981) определялась методом спектрофотометрии в растворе $0,5\text{ mM K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$; $1,0\text{ mM АДФ}$ (pH 7,0); $1,0\text{ mM KCN}$; $1,0\text{ mM K}_2\text{HPO}_4$; $0,1\text{ mg/ml}$ цитохрома C; $1,5\text{ mg/ml}$ BSA и $6\text{ }\mu\text{l}$ ротенона, в общем объеме $2,95\text{ мл}$. Химическая реакция была начата добавлением пальмитоил-L-картина ($20\text{ }\mu\text{l}$) и убыстрена путем добавления оксалоацетата (10 mM). Показатель митохондриальной β -оксидации отображался показателем уменьшения уровня ферроцианида (Уровень уменьшения ферроцианида составлял $1,0 \times 10^3\text{ l/mol/cm}$). Активность ацетил КоА оксидазы (ACO) определялась методом спектрофотометрии путем отслеживания (при 340 nm) динамики продукции NADH, используя в качестве субстрата пальмитоил-КоА. Уровень уменьшения NAD составлял $6,22 \times 10^3\text{ l/mol/cm}$ (Lazarow, 1981). Активность CYP2E1 определялась использованием биохимического метода согласно Yang et al. (1985). При оценке активности CYP2E1, спектрофотометрически измерялась концентрация формальдегида (при 412 nm).

Производство 20-НЕТЕ измерялось для отображения активности CYP2E1, использовался метод жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (LC/MS). Метаболизм арахидоновой кислоты определялся согласно Ito et al. (2006). После инкубации, образцы дважды экстрагировались этилацетатом, с последующим иссушением органического слоя N_2 газом и восстановлением этанолом. 20-НЕТЕ был отделен посредством градиента элюции метанола и воды ($60:40$ в течение 10 минут , затем $85:15$ в течение 10 минут), при скорости истечения $0,2\text{ ml/min}$, через столб адсорбента Zorbax SB-C18 ($3,5\text{ }\mu\text{m}$, $2,1\text{ mm} \times 100\text{ mm}$). Описанные манипуляции выполнялись на масс-спектрометре Trap XCT с ионной ловушкой и источником ионизации (ESI). Зафиксированный негативный переход при мониторинге множественных реакций (MRM), для 20-НЕТЕ являлся $m/z\ 319 \rightarrow 301$. Оптимальные ESI условия включали: давление азотного распылителя 30 psi , температура азотного газа 350°C , при 8 l/min ; электрическое напряжение спрея 4000 V и т. д. Количество опытных образцов 20-НЕТЕ определялось путем сравнения площади пика 20-НЕТЕ с таковым внешнего стандарта.

NADH-убихинон-редуктаза и цитохром c-оксидаза (MRC-IV) определялись согласно Przedborski et al. (1993). MRC-I: реакционный раствор содержал $35\text{ mM K}_3\text{PO}_4$ буфер (pH 7,2), 5 mM MgCl_2 , 2 mM KCN , дополненный $2,5\text{ mg/ml}$ обезжиренным BSA, $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ антимицином А, $65\text{ }\mu\text{M}$ убихинона-1 и $0,13\text{ mM NADH}$. Активность MRC-1 выражалась как разница в уменьшении показателя коэффициента поглощения вследствие NADH оксидации, при 340 nm . MRC-IV: реакционный раствор содержал $8,8\text{ mM K}_3\text{PO}_4$ буфер (pH 7,0) и $0,1\%$ цитохром C. Активность MRC-IV определялась измерением уменьшения показателя коэффициента поглощения вследствие цитохром C оксидации, при 550 nm .

2.7 Оценка MPT

Потенциал митохондриальной мембраны (Zamzami and Kroemer, 2004) наблюдался с использованием родамина 123 для флуоресцентной пробы. Реакционный раствор содержал 15 mM сахарозы, 5 mM сукцината, 5 mM MgCl_2 , $5\text{ mM K}_2\text{HPO}_4$, 20 mM HEPES и $0,5\text{ mM}$ родамина. После определения базисной флуоресцентной интенсивности, при $503/527\text{ nm}$, добавлялись митохондрии к финальной концентрации протеина равной $0,1\text{ mg/ml}$. После инкубации, в течение 30 секунд , наблюдалось изменение флуоресцентной интенсивности на протяжении 5 минут .

Мониторинг и оценка процесса набухания митохондрий проводились согласно методу описанному Hunter et al. (1963). Реакционная среда, содержащая $0,5\text{ mg/ml}$ митохондриального протеина клеток печени, 250 mM сахарозы, $5\text{ mM K}_2\text{HPO}_4$ и 3 mM сукцината, была предварительно инкубирована при температуре 25°C в течение 2 минут . Коэффициент поглощения, при 520 nm , наблюдался непосредственно с использованием спектрофотометра в течение 10 минут , после добавления 300 mM CaCl_2 .

2.8 Выделение суммарного печеночного RNA и проведение RT-PCR анализа

Суммарные печеночные RNA были выделены с использованием реагента Тризол, согласно инструкциям производителя. 500 ng суммарного RNA были использованы для cDNA синтеза, а так же по 5 µl каждого продукта обратной транскрипции было добавлено в 45 µl реакционной среды, содержащей 15 µl 5 x PCR буфера, 0,25 µl 5 U/µl Ex Taq® DNA полимеразы, 1 µl 100 µM соответствующего активатора и 27,75 µl ddH₂O для амплификации PCR. PCR была иницирована при температуре 94°C, в течение 2 минут, с последующими вращениями (23-30 оборотов), при 94°C в течение 30 секунд, при 52-60°C в течение 30 секунд и при 72°C в течение 30 секунд. После последнего оборота, в течение 2 минут образцы находились при температуре 72°C. Число оборотов и температура отжига для каждой пары праймеров были оптимальными. Продукты PCR были отделены электрофорезом, в 1,5% геле агарозы при напряжении 120 V в течение 40 минут, 100 bp DNA лестницы использовались в качестве молекулярного маркера. Цепи были визуализированы посредством этидиум бромид и анализированы BandScan. Гены и их прямые и обратные праймеры изображены в [Table 1](#).

Table 1

Праймеры и условия проведения RT-PCR.

Ген	Прямой праймер 5`-3`	Обратный праймер 5`-3`	Размер продукта (bp)	Обороты по.	Температура отжига	GenBank™ оценка по.
PPARα	aggcagatgacctggaagtc	atgcgtgaactccgtagtgg	312	30	59,8	NM011144
LCAD	aaggattattaagggaagaagc	ggaagcggaggcggagtc	380	26	60	J05029
AOX	cttgctcgcgaagtgagg	caggatccgactgtttacc	216	24	64	AF006688
CYP2E1	cgcttcgattacgatgacaa	gtgctgtgtgctctctgttc	355	24	52	NM021282
CYP4A10	ccaccacaaccggaagg	gctccacaacagtatcagt	294	30	52	NM010011
CYP4A12	cttcatcacaaccaactg	tcttgctctggaagattatt	298	30	52	NM172306
GAPDH	gtcttccaccatggagaagc	attcattgtcataccaggaaa	652	23	55	XR031578

2.9 Статистический анализ данных

Все полученные данные отображались как средние ± SD (среднее отклонение). Дисперсионный анализ (ANOVA) применялся для измерения различий между исследуемыми группами. Статистически значимое значение P принято как равное <0,05.

3. Результаты

3.1 Влияние Бициклола на уровни ALT и AST в сыворотке крови у мышей интоксцированных тетрациклином

Уровни ALT и AST в сыворотке крови были увеличены в 3,85 (181,3 ± 59,6 vs. 47,0 ± 11,6; P<0,0001) и 1,42 (192,6 ± 18,0 vs. 135,4 ± 22,7; P<0,0001) раза соответственно, в сравнении с контрольной группой, ранее чем через 1 час после введения тетрациклина ([Fig. 2B and C](#)). Предшествующее введение Бициклола значительно уменьшало повышение уровней AST и ALT, эффект носил дозозависимый характер ([Table 2](#)).

3.2 Влияние Бициклола при стеатогепатите у мышей интоксцированных тетрациклином

Для оценки степени выраженности стеатогепатита, нами определялись уровни содержания триглицеридов и холестерина в печеночной ткани, также проводилось морфологическое исследование с окраской гематоксином и эозином (H&E). Сведение качественных характеристик к количественным и придание результату численного значения (квантификация), показало увеличение содержания печеночных триглицеридов, через 6 часов после введения тетрациклина, с достижением максимальным значения через 24 часа. Таким образом, содержание триглицеридов печеночной ткани было в 3,7 раза выше, чем в контрольной группе (44,6 ± 10,5 vs. 12,0 ± 0,46; P<0,0001) ([Fig. 2A](#)). Введение Бициклола значительно снижало аккумуляцию печеночных триглицеридов и холестерина, в зависимости от дозировки ([Table 2](#)).

Морфологическое исследование с окраской гематоксином и эозином (H&E) выявило значительный микровезикулярный стеатоз и гидропическую дегенерацию вокруг периферической зоны, через 24 часа после введения тетрациклина мышам ([Fig. 3B](#)), по сравнению с контрольной группой ([Fig. 3A](#)). Этот эффект сочетался с повреждением липидов

печени. Предварительное введение Бициклола заметно улучшало гистологические изменения печеночной ткани, вызванные тетрациклином (Fig. 3C).

3.3 Влияние Бициклола на пероксидацию липидов печени у мышей интоксцированных тетрациклином

Пероксидация липидов печени оценивалась путем измерения содержания реактивных субстратов тиобарбитуровой кислоты (MDA). Образование MDA рассматривается как биологический маркер активности оксидантов. После введения тетрациклина, содержание MDA в печени увеличивалось в 5,4 раза ($1,44 \pm 0,25$ vs. $0,26 \pm 0,5$; $P < 0,0001$), по сравнению с группой контроля. Бициклол (300 mg/kg) значительно снижает повышенный уровень MDA печени на 38% ($0,89 \pm 0,27$ vs. $1,44 \pm 0,25$; $P = 0,0014$; Table 3).

Более того, в настоящем исследовании определялось содержание в печеночной ткани глутатиона (GSH) и активности супероксиддисмутазы (SOD), как параметров антиоксидантной активности. Как показано в Table 3, введение тетрациклина привело к увеличению содержания GSH печени и активности SOD в 2,3 раза ($5,98 \pm 1,33$ vs. $2,58 \pm 1,11$; $P < 0,0001$) и на 29% ($10,9 \pm 2,30$ vs. $8,41 \pm 1,21$; $P < 0,0001$) соответственно. Повышенные уровни GSH и SOD были уменьшены на 30% ($4,72 \pm 0,69$ vs. $5,98 \pm 1,33$; $P < 0,039$) и 21% ($7,28 \pm 2,48$ vs. $10,9 \pm 2,30$; $P < 0,027$) соответственно, у мышей получающих Бициклол (300 mg/kg).

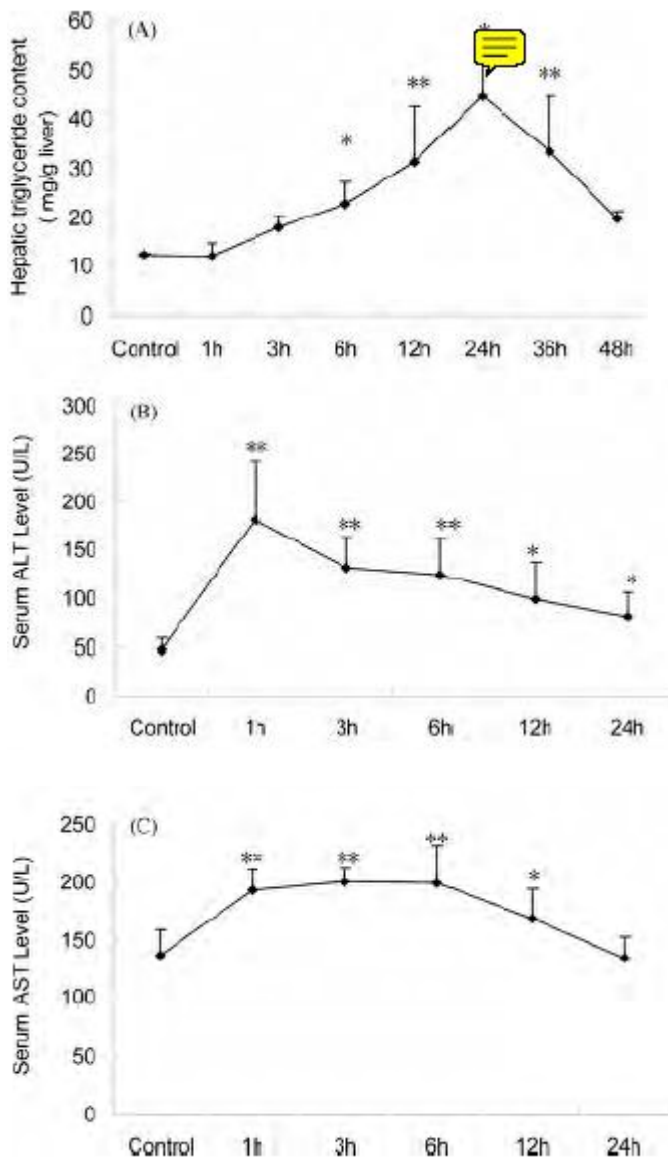


Fig. 2. Изменение во времени содержания триглицеридов печени и уровней сывороточных аминотрансфераз после введения тетрациклина. (A) ALT. (B) AST. (C) Триглицериды печени. Бициклол (75, 150, 300 mg/kg) вводился мышам орально перед введением тетрациклина. Мыши были умерщвлены спустя разные промежутки времени после введения тетрациклина. Данные отображались как среднее отклонение \pm SD (n=8). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ по сравнению с контрольной группой.

Table 2

Влияние Бициклола на уровни ALT, AST и содержание триглицеридов, холестерина в печени у мышей интоксигированных тетрациклином.

Treatment	sALT (U/l)	sAST (U/l)	TG (mg/g liver)	CHO (mg/g liver)
Control	41.2 ± 11.7	167 ± 24.7	10.8 ± 2.67	2.54 ± 0.48
Tetracycline	145 ± 31.4***	273 ± 33.0**	106 ± 17.1**	12.3 ± 2.11**
By 75 mg/kg	69.3 ± 21.1***	223 ± 41.9*	63.3 ± 14.8***	10.4 ± 3.08
By 150 mg/kg	74.2 ± 16.1***	207 ± 27.8**	58.8 ± 17.4***	7.93 ± 1.53***
By 300 mg/kg	56.4 ± 20.4***	198 ± 27.3***	37.3 ± 15.7***	5.98 ± 1.83***
By only	43.2 ± 9.8	174 ± 28.5	12.4 ± 2.33	2.57 ± 0.38

Бициклол (75, 150, 300 mg/kg) вводился мышам орально, три раза, перед инъекцией тетрациклина. Мыши были умерщвлены спустя 24 часа после введения тетрациклина. Данные отображались как среднее отклонение ± SD (n=8).

*** P < 0,001 по сравнению с контрольной группой,

P < 0,05 по сравнению с группой тетрациклина,

P < 0,01 по сравнению с группой тетрациклина,

P < 0,001 по сравнению с группой тетрациклина.

Table 3

Влияние Бициклола на уровни MDA, GSH и SOD у мышей интоксигированных тетрациклином.

Treatment	MDA (nmol/mg pro)	GSH (nmol/mg pro)	SOD (U/mg pro)
Control	0.26 ± 0.05	2.58 ± 1.11	8.41 ± 1.21
Tetracycline	1.44 ± 0.25***	5.98 ± 1.33***	10.9 ± 2.30*
By 300 mg/kg	0.89 ± 0.27##	4.72 ± 0.69#	7.28 ± 2.48#

Бициклол (300 mg/kg) вводился мышам орально, три раза, перед инъекцией тетрациклина. Мыши были умерщвлены спустя 24 часа после введения тетрациклина. Данные отображались как среднее отклонение ± SD (n=8).

* P < 0,05 по сравнению с контрольной группой,

*** P < 0,001 по сравнению с контрольной группой,

P < 0,05 по сравнению с группой тетрациклина,

P < 0,01 по сравнению с группой тетрациклина.

3.4 Влияние Бициклола на уровень ферментов ответственных за оксидацию жирных кислот печени у мышей интоксигированных тетрациклином

ACD, АОХ являются ферментами стадии определяющей скорость химической реакции при β-оксидации жирных кислот в митохондриях и пероксисомах. Считается, что два других фермента CYP2E1 и CYP4A являются ответственными за ω-оксидацию жирных кислот в микросомах. Как показано на Fig. 4, активность ACD, АОХ, CYP2E1 и CYP4A заметно снижается у мышей, которым вводили тетрациклин на 34% (21,6 ± 7,78 vs. 36,1 ± 10,4; P=0,0087), на 40% (3,80 ± 1,48 vs. 6,36 ± 0,52; P=0,001), на 58% (0,33 ± 0,05 vs. 0,80 ± 0,18; P=0,001) и на 30% (93,0 ± 31,8 vs. 131,5 ± 21,1; P=0,046) соответственно. Введение Бициклола (300 mg/kg) значительно улучшало процессы оксидации жирных кислот, доказательством чего служила реверсификация активности этих четырех ферментов на 49% (21,6 ± 7,78 vs. 32,1 ± 10,1; P=0,0058), на 42% (3,80 ± 1,48 vs. 5,39 ± 0,18; P=0,044), на 44% (0,33 ± 0,05 vs. 0,48 ± 0,07; P=0,0078) и в 2,6 раза (93,0 ± 31,8 vs. 334,9 ± 106,1; P=0,0004) соответственно (Fig. 4).

3.5 Влияние Бициклола на активность MRC и MPT у мышей интоксигированных тетрациклином

Существует общее мнение, что дисфункция митохондрий играет критическую роль в патогенезе развития жировой инфильтрации печени. Активность MRC и показатели MPT определялись в настоящем исследовании для оценки функции митохондрий. Значительное уменьшение активности комплексов I, IV дыхательной цепи митохондрий (MRC) печеночных клеток (на 42% и 32%, P=0094, P=0015) наблюдалось по прошествии 24 часов, после введения тетрациклина. Предварительное введение Бициклола (300 mg/kg) приводило показатели MRC комплексов I и IV к нормальным значениям (Fig. 5).

Неспецифическая митохондриальная проницаемость (МРТ) является важным маркером оценки функции митохондрий и целостности митохондриальной мембраны. Результаты, полученные в ходе исследования, показали, что после введения тетрациклина в изолированных митохондриях наблюдалось резкое изменение МРТ, выражающееся в снижении поглощения катионного красителя родамин 123 и понижении чувствительности к Ca^{2+} . Бициклол значительно улучшает спровоцированные тетрациклином изменения, описанные выше (Fig. 6).

3.6 Влияние Бициклола на PPAR α и его гены-мишени у мышей интоксцированных тетрациклином

Дальнейшее исследование проводилось с целью оценки экспрессии на mRNA генов ферментов ответственных за оксидацию жирных кислот, а также их факторов регулирующих транскрипцию. В результате, после введения тетрациклина, экспрессия PPAR α и его генов-мишеней, включая LCAD, CYP4A10 и CYP4A12 уменьшалась на 18% (P=0,004), 20% (P=0,046), 36% (P=0,0055) и 16% (P=0,031) соответственно. Также наблюдалось уменьшение экспрессии CYP2E1 на 18% (P=0,016). Бициклол увеличивал экспрессию PPAR α , LCAD, CYP2E1, CYP4A10 и CYP4A12 до определенного уровня (Table 4 and Fig. 7).

Table 4

Влияние Бициклола на mRNA экспрессию генов ферментов вовлеченных в метаболизм жирных кислот у мышей интоксцированных тетрациклином.

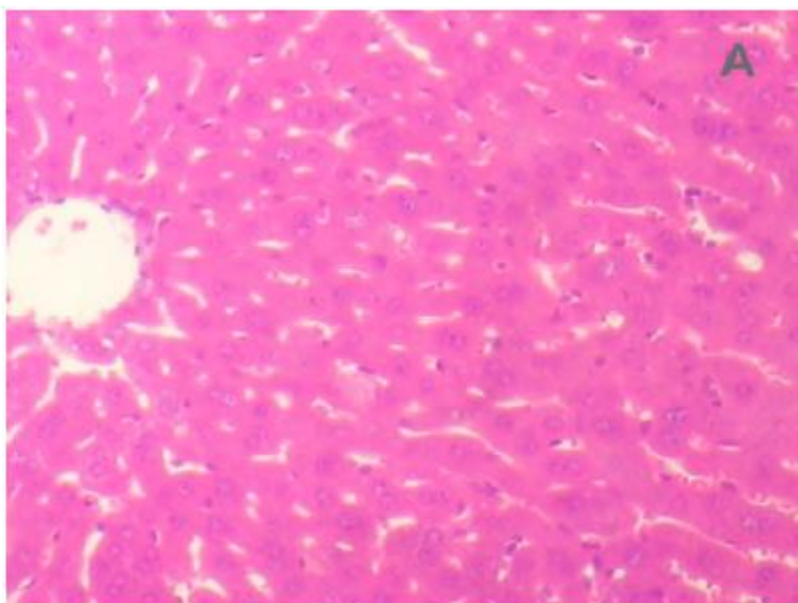
Genes	Control	Tetracycline	By 300 mg/kg
PPAR α	1 \pm 0.06	0.82 \pm 0.03**	0.92 \pm 0.04#
LCAD	1 \pm 0.15	0.80 \pm 0.03*	0.89 \pm 0.04#
AOX	1 \pm 0.11	0.91 \pm 0.08	0.89 \pm 0.17
CYP2E1	1 \pm 0.10	0.82 \pm 0.05*	0.94 \pm 0.08#
CYP4A10	1 \pm 0.15	0.64 \pm 0.08**	0.72 \pm 0.07
CYP4A12	1 \pm 0.09	0.84 \pm 0.07*	0.98 \pm 0.08#

Бициклол (300 mg/kg) вводился мышам орально, три раза, перед инъекцией тетрациклина. Ген GAPDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы) использовали как внутренний контроль для каждого образца. Мыши были умерщвлены спустя 24 часа после введения тетрациклина. Данные отображались относительно контрольной группы мышей (среднее отклонение \pm SD, n=4).

* P < 0,05 по сравнению с контрольной группой,

** P < 0,01 по сравнению с контрольной группой,

P < 0,05 по сравнению с группой тетрациклина.



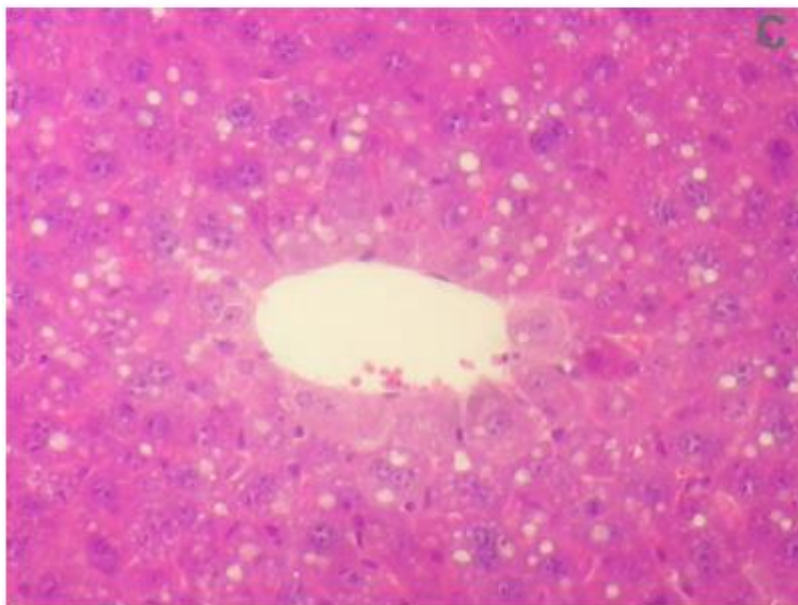
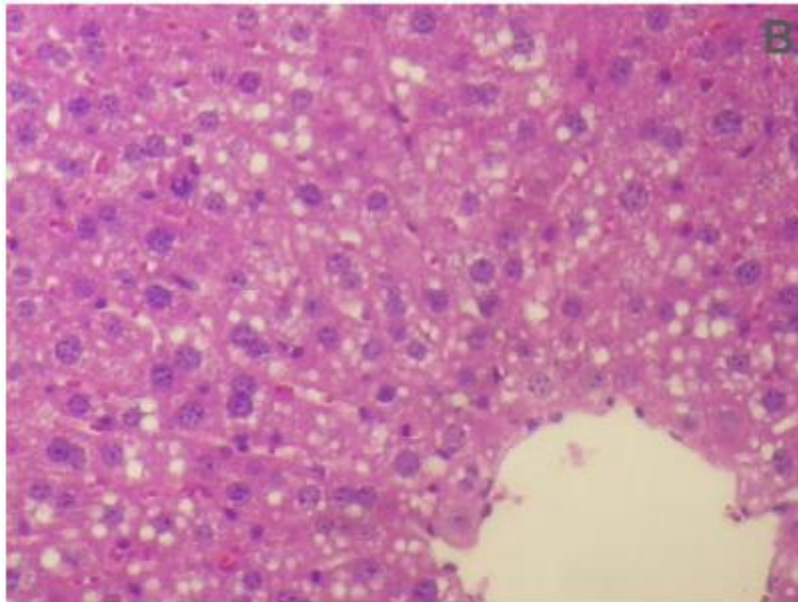
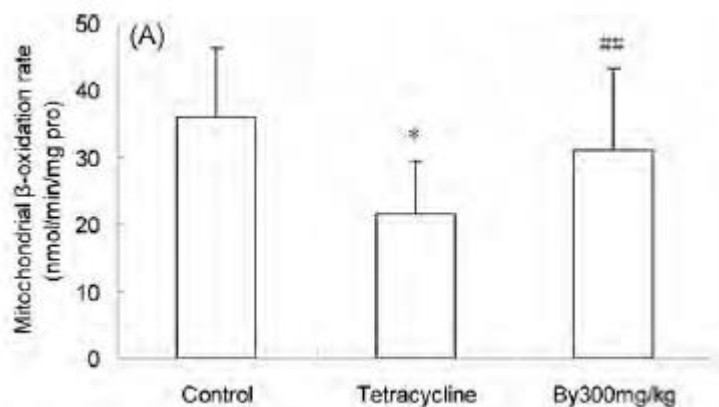


Fig. 3. Влияние Бициклола на выраженность тетрациклин-индуцированного стеатогепатита у мышей. **(А)** Мышь контрольной группы; **(В)** мышь с тетрациклин индуцированным стеатозом; **(С)** мышь с назначением Бициклола (300 mg/kg). Введение тетрациклина провоцировало возникновение микровезикулярного стеатоза и гидropическую дегенерацию перицентральной зоны. Бициклол (300 mg/kg) вводился мышам орально, перед введением тетрациклина. Мыши были умерщвлены спустя 24 часа после введения тетрациклина. Окраска гематоксином и эозином; увеличение оригинала, 100×.



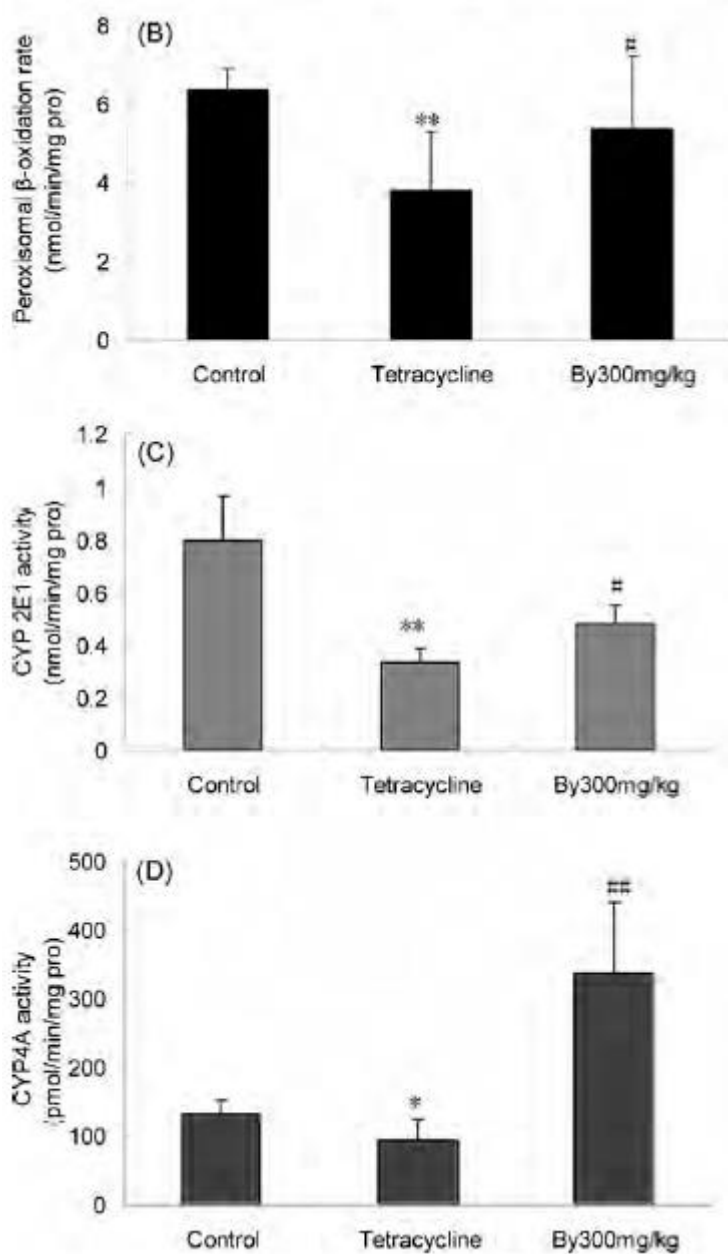


Fig. 4. Влияние Бициклола (300 mg/kg) на активность ферментов ответственных за оксидацию жирных кислот у мышей интоксцированных тетрациклином. (A) уровень β -оксидации в митохондриях (ACD), (B) уровень β -оксидации в пероксисомах (AOX), (C) активность диметилнитрозамин N-диметилазы (CYP2E1), (D) активность ω -гидролазы арахидоновой кислоты (CYP4A). Бициклол (300 mg/kg) вводился мышам орально, перед введением тетрациклина. Мыши были умерщвлены спустя 24 часа после введения тетрациклина. Данные отображались как среднее отклонение \pm SD (n=8).

* P < 0,05, ** P < 0,01 по сравнению с контрольной группой; # P < 0,05, ## P < 0,01, ### P < 0,001 по сравнению с группой тетрациклина.

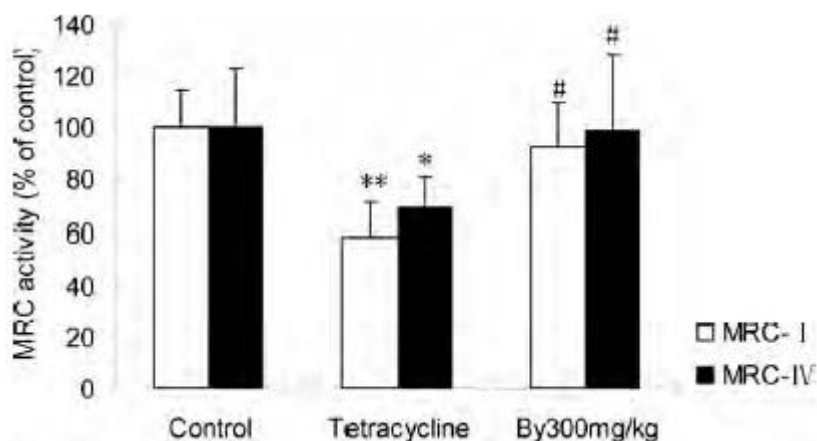


Fig. 5. Влияние Бициклола на активность MRC-I (белый столбик) и MRC-IV (черный столбик) у мышей интоксигированных тетрациклином. Бициклол (300 mg/kg) вводился мышам орально, перед введением тетрациклина. Мыши были умерщвлены спустя 24 часа после введения тетрациклина. Данные отображались как среднее отклонение \pm SD (n=8). * P < 0,05, ** P < 0,01 по сравнению с контрольной группой; # P < 0,05, ## P < 0,01 по сравнению с группой тетрациклина.

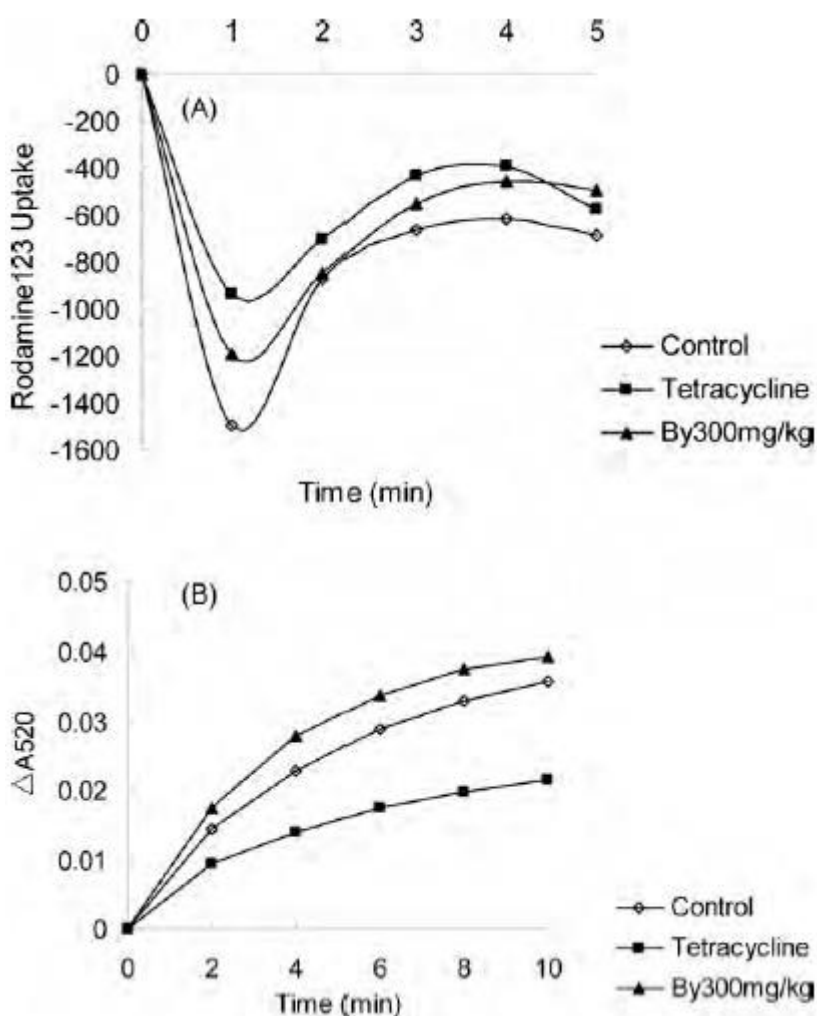


Fig. 6. Влияние Бициклола на митохондриальную неспецифическую проницаемость (МРТ) у мышей интоксигированных тетрациклином. Бициклол (300 mg/kg) вводился мышам орально, перед введением тетрациклина. Мыши были умерщвлены спустя 24 часа после введения тетрациклина. Митохондрии были изолированы немедленно после препарирования печени. (A) Потенциал мембраны митохондрий. (B) Набухание митохондрий.

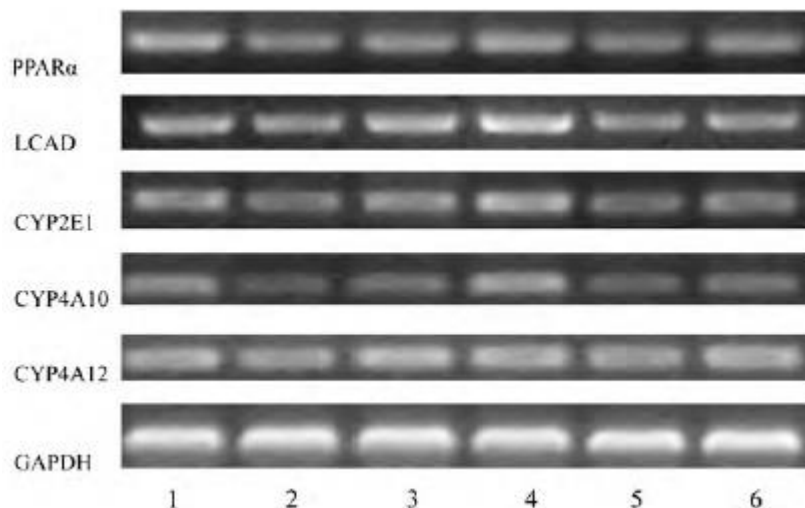


Fig. 7. Печеночная mRNA экспрессия генов участвующих в оксидации жирных кислот.

Бициклол (300 mg/kg) вводился мышам орально, перед введением тетрациклина. Мыши были умерщвлены спустя 24 часа после введения тетрациклина. Митохондрии были изолированы немедленно после препарирования печени. Линии 1 и 4, контроль; линии 2 и 5, тетрациклин; линии 3 и 6, Бициклол (300 mg/kg).

4. Обсуждение

В настоящем исследовании нами продемонстрирована возможность тетрациклина, в разовой дозе 200 mg/kg, вызывать стеатоз у подопытных животных, что сопровождается повышением уровней ALT и AST в сыворотке крови, накоплением триглицеридов и холестерина в печени и морфологическими изменениями (появление мелких капель жира в цитоплазме и гидропическая дегенерация гепатоцитов), что свидетельствует о ранних признаках развития NASH у мышей. Основываясь на полученных ранее данных, (Labbe et al., 1991; Letteron et al., 1996, 2003), в наших предварительных исследованиях использовались различные концентрации тетрациклина (от 120 до 220 mg/kg), для определения оптимальной дозы. В результате, не было замечено развитие выраженного стеатоза при дозировке тетрациклина 120 mg/kg, в то время как 200 mg/kg стимулировало равномерное развитие стеатоза. При назначении тетрациклина в дозировке 220 mg/kg, не наблюдалось значимого усугубления клинической картины стеатогепатита. Поэтому в настоящем исследовании использовалась доза тетрациклина в 200 mg/kg.

Предварительное введение Бициклола значительно снижало выраженность тетрациклин индуцированного стеатоза у подопытных животных, снижает повышенные уровни ALT и AST в сыворотке крови, смягчает биохимические и патологические проявления аккумуляции липидов печени. Более того, исследовались показатели функции печени у мышей, получающих только Бициклол (300 mg/kg), каких либо нарушений этих показателей не было замечено, что свидетельствует об отсутствии пагубного влияния Бициклола на функцию печени.

В наших предварительных исследованиях сравнивалась эффективность Бициклола назначаемого до, и после введения тетрациклина. Было установлено, что только высокая доза Бициклола (300 mg/kg), назначаемого после введения тетрациклина, обладает выраженным протективным эффектом. В то же время предварительное назначение Бициклола в меньшей дозировке также обладает протективным действием, но степень выраженности его прямо пропорциональна дозе препарата. Таким образом, настоящее исследование проводилось с целью изучения и оценки гепатопротекторных механизмов оказываемых Бициклолом при предварительном назначении.

Основной причиной тетрациклин-индуцированного стеатоза является нарушение β -оксидация жирных кислот (Fréneaux et al., 1988; Labbe et al., 1991; Letteron et al., 1996). Доказано, что процессы оксидации жирных кислот происходят в трех внутриклеточных органеллах. Митохондрии и пероксисомы разрушают жирные кислоты посредством процессов β -оксидации, в то время как гладкий эндоплазматический ретикулум метаболизирует жирные кислоты посредством ω -оксидации, при помощи ферментов семейства CYP2E1 и CYP4A. Несколько ключевых ферментов (такие как LCAD, AOX, CYP4A) регулируются

транскрипционно, при участии α рецепторов, активирующих пролиферацию пероксисом (PPAR α) (Yu et al., 2003; Cave et al., 2007; Kohjima et al., 2007). Предшествующие исследования показали, что мыши с инактивированными PPAR α страдали от серьезных нарушений процесса оксидации жирных кислот, в итоге приводящих к развитию жировой дистрофии печени (Kersten et al., 1999). Введение агонистов PPAR α приводило к развертыванию клинической картины NASH у мышей (Seo et al., 2008). В настоящем исследовании нами обнаружено, что митохондриальная β -оксидация снижалась после введения тетрациклина, как и в предварительном исследовании. Впервые выявлено, что активность ферментов ответственных за оксидацию жирных кислот в пероксисомах (AOX) и микросомах (CYP2E1, CYP4A), также уменьшалась тетрациклином у мышей. Более того, mRNA уровни LCAD, CYP4A10, CYP4A12 и регулирующего фактора транскрипции, PPAR α , также понижались. Эти данные подтверждают нашу гипотезу, что тетрациклин-индуцированное снижение оксидации жирных кислот связано с нарушением PPAR α регуляторного механизма.

Введение Бициклола препятствовало снижению PPAR α и увеличивало скорость оксидации жирных кислот, как на ферментном, так и на mRNA уровнях. Эти данные свидетельствуют о том, что Бициклом препятствует развитию стеатоза, т. е. обладает гепатопротекторным эффектом, вследствие регулирования нарушений экспрессии PPAR α и его генов-мишеней. Пероксисомальные и микросомальные системы являются двумя второстепенными путями ответственными за оксидацию жирных кислот. Запуск вышеупомянутых путей окисления способен помочь метаболизму жирных кислот, однако, параллельно происходит продукция большого количества ROS (Robertson et al., 2001; Yu et al., 2003; Shiota, 2005). Результаты наших исследований показали, что тетрациклин ингибирует активность AOX, CYP2E1 и CYP4A, несмотря на это наблюдалось значительное накопление продуктов пероксидации липидов. Исходя из этого, нами предложена гипотеза, согласно которой оксидативное повреждение тканей может осуществляться через другие пути реализации. Существует общепринятое мнение, что дисфункция митохондрий, особенно недостаточность митохондриальной респираторной цепи (MRC), играет ключевую роль в патофизиологии неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD). Pérez-Carreras et al. (2003) впервые доложил, что пациенты с NASH имеют нарушения MRC в печени. Уменьшенная активность MRC наблюдалась у ob/ob мышей (модель сахарного диабета II типа) и у крыс с холин-дефицитной (CD) диетой (Petrosillo et al., 2007). Нарушение активности MRC определяется сегодня как дополнительный ключевой источник продукции ROS. Формирование ROS и нарушение активности MRC образуют замкнутый патологический круг и ускоряют развитие NAFLD (Pessayre et al., 2002). В настоящем исследовании нами обнаружено значительное уменьшение ферментов митохондриального окислительного фосфорилирования, комплексов I и IV дыхательной цепи митохондрий (MRCI и MRCIV) после введения тетрациклина, что объясняет увеличение количества продуктов перекисного окисления липидов. Более того, у мышей интоксигированных тетрациклином наблюдалась деполяризация мембраны и набухание митохондрий, вследствие увеличения проницаемости для ионов внутренней мембраны митохондрий (PT), вызванное атакой ROS (Ly et al., 2003). Полученные данные подтверждают точку зрения, что дисфункция митохондрий играет основную роль в развитии тетрациклин индуцированного печеночного стеатоза. Бициклом увеличивает активность комплексов I и IV MRC, уменьшает набухание митохондрий и нормализует мембранный потенциал митохондрий. Таким образом, улучшение функции митохондрий является важным механизмом, обуславливающим протективный эффект Бициклола при печеночном стеатозе. Оксидативный стресс является другим важным патогенетическим фактором в возникновении и развитии NASH. Избыток ROS или дефект молекул антиоксидантов могут привести к повреждению клетки (Robertson et al., 2001; Yu et al., 2003). В настоящем исследовании, неферментный антиоксидант глутатион (GSH) и ферментный антиоксидант супероксиддисмутаза (SOD) определялись для оценки окислительно-восстановительного потенциала при тетрациклин индуцированном жировом гепатозе. Уменьшение активности этих антиоксидантов не наблюдалось. Напротив, содержание GSH и активность SOD увеличивались у мышей интоксигированных тетрациклином, видимо, компенсаторно, с целью выведения свободных радикалов. Предварительное введение Бициклола поддерживало показатели GSH и SOD на нормальных уровнях, возможно из-за ингибирования продукции ROS, поэтому не происходило компенсаторного увеличения уровня этих антиоксидантов.

Сопоставляя полученные данные с таковыми предшествующего исследования, где Бициклом удалял свободные радикалы, продуцируемые под действием CCL₄ и алкоголя (Liu et al., 2005; Zhao et al., 2008), можно сделать вывод, что протективный эффект Бициклола при тетрациклин индуцированном жировом гепатозе, обусловлен также его способностью поддерживать баланс между продукцией и удалением из организма реактивных форм кислорода (ROS).

5. Выводы

У мышей наблюдалось развитие типичного стеатоза печени после разового введения им тетрациклина. Механизм развития стеатоза определен как частично из-за ингибирования экспрессии PPAR α и его генов-мишеней, а также дисфункции митохондрий. Бициклом показал выраженный гепатопротекторный эффект при тетрациклин-индуцированном стеатозе печени, вследствие регулирования нарушений сигнального ядерного PPAR α пути и защиты митохондрий от повреждений.

Заявление о конфликте интересов

Мы заявляем, что не имели конфликта интересов.

Благодарность

Данное исследование осуществилось при поддержке National Grand Fundamental Research 973 Program of China, грант № 2004CB518908. Мы благодарим профессора Naikung Zhao за осуществленный гистопатологический анализ.

Список использованной литературы

- Adams, L.A., Angulo, P., Lindor, K.D., 2005. Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ* 172, 899–905.
- Appelkvist, E.L., Brunk, U., Dallner, G., 1981. Isolation of peroxisomes from rat liver using sucrose and Percoll gradients. *J. Biochem. Biophys. Methods* 5 (4), 203–217.
- Cave, M., Deaciuc, I., Mendez, C., Song, Z., Joshi-Barve, S., Barve, S., McClain, C., 2007. Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. *J. Nutr. Biochem.* 18 (3), 184–195.
- Chitturi, S., Farrell, G.C., 2001. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin. Liver Dis.* 21 (1), 27–41.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77.
- Fréneaux, E., Labbe, G., Letteron, P., The Le Dinh, Degott, C., Genève, J., Larrey, D., Pessayre, D., 1988. Inhibition of the mitochondrial oxidation of fatty acids by tetracycline in mice and in man: possible role in microvesicular steatosis induced by this antibiotic. *Hepatology* 8 (5), 1056–1062.
- García-Ruiz, I., Rodríguez-Juan, C., Díaz-Sanjuán, T., Martínez, M.A., Muñoz-Yagüe, T., Solís-Herruzo, J.A., 2007. Effects of rosiglitazone on the liver histology and mitochondrial function in ob/ob mice. *Hepatology* 46 (2), 414–423.
- George, J., Liddle, C., 2008. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and potential for nuclear receptors as therapeutic targets. *Mol. Pharm.* 5 (1), 49–59.
- Hunter Jr., F.E., Gebicki, J.M., Hoffsten, P.E., 1963. Swelling and lysis of rat liver mitochondria induced by ferrous ions. *J. Biol. Chem.* 238, 828–835.
- Ip, E., Farrell, G.C., Robertson, G., Hall, P., Kirsch, R., Leclercq, I., 2003. Central role of PPAR α -dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology* 38 (1), 123–132.
- Ito, O., Nakamura, Y., Tan, L., Ishizuka, T., Sasaki, Y., Minami, N., Kanazawa, M., Ito, S., Sasano, H., Kohzaki, M., 2006. Expression of cytochrome P-450 4 enzymes in

- the kidney and liver: regulation by PPAR and species-difference between rat and human. *Mol. Cell. Biochem.* 284 (1/2), 141–148.
- Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Desvergne, B., Wahli, W., 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest.* 103 (11), 1489–1498.
- Kohjima, M., Enjoji, M., Higuchi, N., Kato, M., Kotoh, K., Yoshimoto, T., Fujino, T., Yada, M., Yada, R., Harada, N., Takayanagi, R., Nakamuta, M., 2007. Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int. J. Mol. Med.* 20 (3), 351–358.
- Labbe, G., Fromenty, B., Freneaux, E., Morzelle, V., Letteron, P., Berson, A., Pessayre, D., 1991. Effects of various tetracycline derivatives on in vitro and in vivo beta-oxidation of fatty acids, egress of triglycerides from the liver, accumulation of hepatic triglycerides, and mortality in mice. *Biochem. Pharmacol.* 41 (4), 638–641.
- Lazarow, P.B., 1981. Assay of peroxisomal beta-oxidation of fatty acids. *Methods Enzymol.* 72, 315–319.
- Letteron, P., Fromenty, B., Terris, B., Degott, C., Pessayre, D., 1996. Acute and chronic hepatic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice. *J. Hepatol.* 24 (2), 200–208.
- Letteron, P., Sutton, A., Mansouri, A., Fromenty, B., Pessayre, D., 2003. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein: another mechanism for drug-induced steatosis in mice. *Hepatology* 38 (1), 133–140.
- Liu, G.T., 2001. The anti-virus and hepatoprotective effect of bicyclol and its mechanism of action. *Chin. J. New Drug Clin.* 10, 325–327.
- Liu, G.T., Li, Y., Wei, H.L., Zhang, H., Xu, J.Y., Yu, L.H., 2005. Mechanism of protective action of bicyclol against CCl₄-induced liver injury in mice. *Liver Int.* 25 (4), 872–879.
- Ly, J.D., Grubb, D.R., Lawen, A., 2003. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$) in apoptosis; an update. *Apoptosis* 8 (2), 115–128.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 44, 276–278.
- Osmundsen, H., 1981. Spectrophotometric procedure for measuring mitochondrial beta-oxidation. *Methods Enzymol.* 72, 306–314.
- Pérez-Carreras, M., Del Hoyo, P., Martín, M.A., Rubio, J.C., Martín, A., Castellano, G., Colina, F., Arenas, J., Solís-Herruzo, J.A., 2003. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 38 (4), 999–1007.
- Pessayre, D., Mansouri, A., Fromenty, B., 2002. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 282 (2), G193–G199.
- Petrosillo, G., Portincasa, P., Grattagliano, I., Casanova, G., Matera, M., Ruggiero, F.M., Ferri, D., Paradies, G., 2007. Mitochondrial dysfunction in rat with nonalcoholic fatty liver involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin. *Biochim. Biophys. Acta* 1767 (10), 1260–1267.
- Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Muthane, U., Jiang, H., Ferreira, M., Naini, A.B., Fahn, S., 1993. Chronic levodopa administration alters cerebral mitochondrial respiratory chain activity. *Ann. Neurol.* 34 (5), 715–723.
- Robertson, G., Leclercq, I., Farrell, G.C., 2001. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 281 (5), G1135–G1139.
- Seo, Y.S., Kim, J.H., Jo, N.Y., Choi, K.M., Baik, S.H., Park, J.J., Kim, J.S., Byun, K.S., Bak, Y.T., Lee, C.H., Kim, A., Yeon, J.E., 2008. PPAR agonists treatment is effective in a non-alcoholic fatty liver disease animal model by modulating fatty-acid metabolic enzymes. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 23 (1), 102–109.
- Shiota, G., 2005. Loss of function of retinoic acid in liver leads to steatohepatitis and liver tumor: a NASH animal model. *Hepatol. Res.* 33 (2), 155–160.
- Yang, C.S., Tu, Y.Y., Koop, D.R., Coon, M.J., 1985. Metabolism of nitrosamines by purified rabbit liver cytochrome P-450 isozymes. *Cancer Res.* 45 (3), 1140–1145.
- Yu, S., Rao, S., Reddy, J.K., 2003. Peroxisome proliferator-activated receptors, fatty acid oxidation, steatohepatitis and hepatocarcinogenesis. *Curr. Mol. Med.* 3 (6), 561–572.
- Zamzami, N., Kroemer, G., 2004. Methods to measure membrane potential and permeability transition in the mitochondria during apoptosis. *Methods Mol. Biol.* 282, 103–115.
- Zhao, J., Chen, H., Li, Y., 2008. Protective effect of bicyclol on acute alcohol-induced liver injury in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 586 (1–3), 322–331.