

# ТОКСИКОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

## ВЛИЯНИЕ СТИМУЛЯЦИИ И ДЕПРЕССИИ МАКРОФАГОВ НА РАЗВИТИЕ ОСТРОГО ТОКСИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА У КРЫС, ВЫЗВАННОГО ПАРАЦЕТАМОЛОМ

О. А. Левина<sup>1</sup>, И. А. Гончарова<sup>2</sup>, Т. Г. Филатова<sup>1</sup>, А. Н. Надеев<sup>3</sup>, Т. А. Короленко<sup>1</sup>, Т. Г. Сухенко<sup>4</sup>, О. П. Колесникова<sup>4</sup>

Исследовали роль стимуляции и депрессии макрофагов в развитии повреждения печени, вызываемого парацетамолом. Показано, что предварительное введение крысам карбоксиметилированного (1 → 3)-β-D-глюкана (стимуляция макрофагов) или хлористого гадолиния (депрессия макрофагов) оказывает защитный эффект, нормализуя нарушенные функциональные пробы и уменьшая признаки морфологического поражения печени. Обсуждается связь обнаруженных изменений с секрецией макрофагами ФНО-α.

**Ключевые слова:** парацетамол, токсический гепатит, макрофаги

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что высокие дозы парацетамола у человека могут приводить к острой печеночной недостаточности, сопровождающейся центрлобулярной дегенерацией и некрозом гепатоцитов [1, 8]. Токсичность парацетамола обусловлена взаимодействием его метаболита N-ацетил-p-бензохинонимина с белками печени и снижением уровня глутатиона в гепатоцитах [10]. Высказано предположение, что изменение функциональной активности непаренхиматозных клеток печени (макрофагов, эндотелиальных клеток) имеет существенное значение в проявлении токсического действия парацетамола на печень [2, 11]. В данной работе проанализирована роль печеночных макрофагов (клеток Купфера, КК) в механизме развития острого токсического гепатита, вызываемого введением животным высоких доз парацетамола.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Использовали крыс-самцов линии Вистар массой 200 – 250 г (виварий Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск). Токсический гепатит вызывали введением крысам ацетаминофена (парацетамола) (“ICN Biomedicals”, США) в дозе 1000 мг/кг, однократно внутрь [8]. Оценку степени поражения печени проводили через 24 ч после введения препарата. Для стимуляции макрофагов печени использовали карбок-

симетилированный (1 → 3)-β-D-глюкан (КМГ, производство Химического института Словацкой АН, Братислава, Словакия) в дозе 25 мг/кг, внутривенно за 48 ч до парацетамола. КМГ, как показано нами, в этой дозе увеличивает число макрофагов печени и вторичных лизосом в клетках [7]. Депрессию макрофагов вызывали однократным внутривенным введением крысам хлористого гадолиния (GdCl<sub>3</sub>) в дозе 7,5 мг/кг за 24 ч до парацетамола [5].

Определение уровня ФНО-α проводили в супернатанте перитонеальных макрофагов, используя ФНО-чувствительную клеточную линию L-929 [4]. Для стандартной кривой использовали мышинный рекомбинантный ФНО-α. Результаты выражали в пг/мл ФНО-α.

Функциональные пробы печени (активность АЛТ, АСТ) в сыворотке крови животных определяли, используя биохимический анализатор Cobas Mira (Австрия) и наборы фирмы “Bioscop” (Германия). Результаты активности ферментов выражали в Ед/л.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерных программ “STATISTIKA”, используя *t*-тест Стьюдента (сравниваемые величины считали достоверными при *p* < 0,05).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В отдельной серии экспериментов обнаружено, что КМГ повышал продукцию ФНО-α перитонеальными макрофагами. Уровень ФНО-α в супернатанте макрофагов интактных животных был 333 ± 30, с введением КМГ-831 ± 80 пг/мл; положительный контроль при введении животным стимулятора макрофагов зимозана в дозе 10 мг/100 г через 6 ч составил 1560 ± 200 пг/мл.

<sup>1</sup> Лаборатория клеточной биохимии (зав. — Т. А. Короленко) ГУ НИИ физиологии СО РАМН, Новосибирск, 630117, ул. Тимакова, 4.

<sup>2</sup> Муниципальная инфекционная больница № 1, Новосибирск.

<sup>3</sup> Новосибирская медицинская академия, Новосибирск.

<sup>4</sup> Институт Клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск.

Таблица 1. Влияние хлористого гадолиния и карбоксиметилированного (1 → 3)-β-D-глюкана (КМГ) на функциональные пробы печени животных с токсическим гепатитом, вызванным парацетамолом ( $M \pm m$ )

Группа	АЛТ, Ед/л	АСТ, Ед/л
Контроль ( $n = 8$ )	104 ± 6,5	298,6 ± 28,53
Парацетамол ( $n = 10$ )	1367 ± 532,0*	4411 ± 210*
GdCl <sub>3</sub> ( $n = 5$ )	98,8 ± 6,24	254,3 ± 21,63
КМГ ( $n = 5$ )	113,3 ± 10,1	238,3 ± 12,93
GdCl <sub>3</sub> + парацетамол ( $n = 8$ )	458,5 ± 141,9*	896,5 ± 32,9*
КМГ + парацетамол ( $n = 7$ )	136,2 ± 7,86*	224,7 ± 14,12*

Примечание. Здесь и в табл. 2: \* —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем. В скобках — число животных.

Светооптическое исследование срезов печени у крыс с введением парацетамола выявило развитие токсического гепатита с выраженными очагами некроза (центро-портальные и порто-портальные) и с лимфо- и макрофагальной инфильтрацией. Гепатоциты находились в состоянии мелко- и средневакуолярной дистрофии, местами наблюдали баллонную дистрофию гепатоцитов, пролиферацию синусоидальных клеток. Предварительное введение животным стимулятора макрофагов КМГ предотвращало развитие некроза печени и баллонной дистрофии и значительно улучшало микроструктуру гепатоцитов. Депрессия макрофагов, вызываемая предварительным введением GdCl<sub>3</sub>, снижала размеры очагов центральнобулярных некрозов по сравнению с группой с использованием парацетамола.

Введение парацетамола сопровождалось значительными нарушениями функциональных проб печени; по сравнению с контролем отмечено увеличение активности АЛТ и АСТ в сыворотке крови в 10–13 раз (табл. 1). Предварительное использование КМГ предупреждало нарушение функций печени, вызванное парацетамолом. КМГ не оказывал влияния на активность этих ферментов у интактных крыс (табл. 1). GdCl<sub>3</sub> также уменьшал токсическое поражение печени парацетамолом, но и в меньшей степени по сравнению с КМГ (см. табл. 1).

При исследовании клеточного состава периферической крови обнаружено, что введение парацетамола вызывало снижение общего числа лейкоцитов по срав-

нению с контролем (табл. 2). Введение КМГ интактным животным вызывало относительную нейтропению и тенденцию к лимфоцитозу (см. табл. 2). Количество и состав лейкоцитов периферической крови в группах с сочетанным воздействием КМГ, GdCl<sub>3</sub> и парацетамола не отличалось от соответствующих показателей у интактных животных.

Нами показано увеличение продукции ФНО-α макрофагами под воздействием КМГ. Известно, что при воспалении клетки печени синтезируют и секретируют первичные медиаторы воспаления — цитокины, среди которых основными являются ФНО-α, ИЛ-6, ИЛ-8 [2, 3, 6]. Цитокины индуцируют нейтрофилы к освобождению биологически активных молекул — H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, активных радикалов кислорода, эластазы с одновременным угнетением активности каталазы пероксисом гепатоцитов [9, 12]. Возможно, поэтому предварительное применение клофибрата — активатора пероксисом, подавляющего синтез H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> — значительно снижает токсическое поражение печени парацетамолом [13].

Нами обнаружен защитный эффект КМГ, стимулирующего макрофаги печени (и повышающего продукцию ФНО-α в изолированных макрофагах), и GdCl<sub>3</sub>, вызывающего депрессию макрофагов печени при остром токсическом повреждении печени, вызванным парацетамолом. Согласно данным литературы предварительная стимуляция макрофагов печени липополисахаридом также оказывала защитный эффект при токсическом поражении печени [8]. Положительное действие стимуляции макрофагов показано также на моделях сепсиса, вызванного липополисахаридом, при острой кровопотере [7]. Возможно, предварительно стимулированные макрофаги повторно не выделяют большого количества цитокинов и за счет этого в меньшей степени вовлекаются в развитие токсического поражения печени.

При парацетамоловом гепатите нами обнаружен защитный эффект GdCl<sub>3</sub>, вызывающего депрессию печеночных макрофагов. Известно, что введение GdCl<sub>3</sub> крысам уменьшает секрецию макрофагами ФНО-α и ИЛ-6, снижая степень их участия в воспалительном процессе [15]. Одновременно GdCl<sub>3</sub> селективно удаляет макрофаги из печени, а также понижает выделение ими NO и продуктов перекисного окисления [11]. Оче-

Таблица 2. Влияние хлористого гадолиния и карбоксиметилированного (1 → 3)-β-D-глюкана (КМГ) на количество и состав лейкоцитов периферической крови животных с токсическим гепатитом, вызванным парацетамолом ( $M \pm m$ )

Группа	Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	Нейтрофилы %	Лимфоциты, %	Моноциты, %
Контроль ( $n = 8$ )	11,6 ± 2,46	30 ± 3,72	63,3 ± 5,06	6,8 ± 2,49
Парацетамол ( $n = 10$ )	6,8 ± 1,29*	36,8 ± 2,8	59,2 ± 2,41	4 ± 0,82
GdCl <sub>3</sub> ( $n = 5$ )	8,4 ± 1,62	26,8 ± 3,99	66,0 ± 4,02	7,3 ± 2,02
КМГ ( $n = 5$ )	13,6 ± 0,63	14,5 ± 1,19*	76,5 ± 2,05	9 ± 1,63
GdCl <sub>3</sub> + парацетамол ( $n = 8$ )	10,9 ± 2,05	29 ± 3,11	65,0 ± 3,43	6 ± 1,39
КМГ + парацетамол ( $n = 7$ )	10,9 ± 2,57	21,2 ± 5,56	72,2 ± 2,21	6,7 ± 1,12 4

видно, механизм защитного действия исследованных соединений при парацетамолом гепатите связан с секреторной активностью макрофагов и нуждается в дальнейшем изучении.

## ВЫВОДЫ

1. Острый токсический гепатит у крыс, вызываемый однократным введением парацетамола в дозе 1000 мг/кг, 24 ч спустя характеризуется значительными нарушениями функциональных проб печени (активность АЛТ, АСТ) и появлением очагов некроза.

2. Стимуляция (и карбоксиметилированный (1 → 3)-β-D-глюкан) и депрессия (GdCl<sub>3</sub>) макрофагов печени предотвращает развитие повреждения печени парацетамолом, нормализуя функциональные пробы и структурные изменения клеток печени.

3. Изменение секреции ФНО-α макрофагами может обуславливать степень поражения печени при действии парацетамола.

## ЛИТЕРАТУРА

1. А. И. Венгеровский, А. С. Саратиков, *Фармакол. и токсикол.*, **54**(1), 76 – 80 (1991).
2. В. Т. Ивашкин, *Рос. журн. гастроэнтерол.*, **14**(5), 13 – 17 (1998).
3. L. D. DeLeve, X. Wang, N. Kaplowitz, and A. van der Hoek, *Biochem. Pharmacol.*, **53**(9), 1339 – 1345 (1997).
4. D. A. Flick and G. E. Gifford, *J. Immunol. Methods*, **68**, 167 – 175 (1984).
5. M. J. Hardonk, et al., *Cell of the Hepatic Sinusoid*, V. 5. Eds. E. Wisse, et al. Leiden, *Kupffer Cell Foundation*, (1995), 29 – 35.
6. J. A. Hinson, S. L. Michael, S. G. Ault, and N. R. Pumford, *Toxicol. Sci.*, **53**(2), 467 – 473 (2000).
7. T. A. Korolenko, I. Svechnikova, K. Urazgaliyev, et al., *Cellular Peptidases in Immune Functions and Diseases*, Plenum Press, New York, 315 – 321 (1997).
8. D. L. Laskin, C. R. Gardner, V. F. Price, and D. J. Jollow, *Hepatology*, **21**(4), 1045 – 1050 (1985).
9. S. Lores-Arnaiz, S. Lesuy, J. C. Cutrin, and A. Boveris, *Free Radic. Biol. Med.*, **19**(3), 303 – 310 (1995).
10. A. M. Matthews, D. W. Roberts, J. A. Hinson, and N. R. Pumford, *Drug Metab. Dispos.*, **24**(11), 1192 – 1196 (1996).
11. S. L. Michael, N. R. Pumford, M. R. Niesman, and J. A. Hinson, *Hepatology*, **30**(1), 186 – 195 (1999).
12. O. Mirochnichenko, M. Neisborot-Lefkowitz, and C. Yang, *M. J. Biol. Chem.*, **274**(15), 10349 – 10355 (1999).
13. F. A. Nickolls-Grzemeski, I. C. Calder, B. C. Priestly, and P. C. Burchan, *Toxicol. Science*, **56**(1), 220 – 228 (2000).
14. J. Shi, Y. Kokubo, and K. Wake, *Blood*, **92**(2), 520 – 528 (1998).
15. Y. Shiratory, S. Hongo, Y. Hikuba and M. Omata, *Dig. Dis. Sci.*, **41**(10), 1939 – 1946 (1996).

Поступила 26.01.02

## THE ROLE OF MACROPHAGE STIMULATION AND SUPPRESSION IN THE DEVELOPMENT OF PARACETAMOL-INDUCED ACUTE TOXIC HEPATITIS IN RATS

O. A. Levina, I. A. Goncharova, T. G. Filatova, A. N. Nadeev, T. A. Korolenko, T. G. Sukhenko, O. P. Kolesnikova

Laboratory of Cell Biochemistry, Institute of Physiology, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, Ti-makova Str., 4, Novosibirsk, 630117 Russia

The role of macrophage (Kupffer cell) stimulation and suppression in the development of a toxic liver damage was studied in rats with acute hepatitis induced by paracetamol (acetaminophen, 1000 mg/kg). Pretreatment with carboxymethylated (1 → 3)-β-D-glucan (25 mg/kg, i.p., 48 h before paracetamol) for the macrophage stimulation or with gadolinium chloride (GdCl<sub>3</sub>, 7.5 mg/kg, i.v., 24 h before paracetamol) for the macrophage suppression has a protective effect manifested by normalization of the liver function test parameters and by a decrease in the degree of morphological changes in the liver cells. A relation between these positive effects and the TNF-α secretion by macrophages is discussed.