

ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫЙ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТЫ ИНФЛИКСИМАБА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АЛКОГОЛЬНОМ СТЕАТОГЕПАТИТЕ

П. Ч. Кирвель¹, М. В. Горецкая², О. Я. Лукивская¹, Е. Е. Нарута¹,
Е. Б. Белоновская¹, В. У. Буко¹

Исследовано влияние инфликсимаба (1 и 10 мг/кг внутривенно, в течение 10 дней) на развитие алкогольного стеатогепатита у крыс, потреблявших жидкий этанолсодержащий корм в течение 10 недель. Показано, что иммуномодулирующий и противовоспалительный эффекты наблюдаются при использовании обеих доз препарата, тогда как только в более высокой дозе инфликсимаб значительно снижает аккумуляцию липидов в печени. Таким образом, инфликсимаб (10 мг/кг) является эффективным гепатопротектором, противовоспалительным агентом и иммуномодулятором при экспериментальном алкогольном стеатогепатите у крыс.

Ключевые слова: инфликсимаб, алкогольный стеатогепатит, цитокины, фактор некроза опухолей альфа, печень

ВВЕДЕНИЕ

Алкоголь является одной из основных причин хронических заболеваний печени. Алкогольная болезнь печени (АБП) объединяет различные нарушения структуры и функций печени, вызванные длительным и систематическим употреблением алкогольных напитков. Хронический алкогольный стеатогепатит (АСГ) является одной из форм алкогольной болезни печени и представляет хроническое поражение воспалительного характера, вызванное токсическим воздействием этанола и продуктов его распада [1].

Известно, что иммунные механизмы частично ответственны за начало и/или прогрессирование АБП. Ранее хроническое употребление этанола связывали с иммуносупрессивным состоянием, однако в последнее время все чаще говорят о патологической активации иммунной системы, которая сопровождается воспалительными явлениями в ткани печени, что может приводить к апоптозу и некрозу гепатоцитов, холестазу и фиброзу. Прогресс в понимании механизмов патогенеза АБП, и особенно, алкогольного стеатогепатита, в последние годы связывают с изучением цитокинов [9, 11]. Цитокины — регуляторные пептиды, которые продуцируются практически всеми ядерными клетками тела, включая почти все типы клеток печени. Среди разнообразных цитокинов фактор некроза опухолей альфа (ФНО- α) оказывает существенное влияние на развитие патологии печени. Экспериментальные и клинические данные свидетельствуют, что этот основ-

ной провоспалительный цитокин опосредует как ранние стадии развития стеатоза печени, так и переход на стадию стеатогепатита [7]. Поэтому ингибирование ФНО- α , которое может приводить к уменьшению воспалительных изменений в печени, рассматривается как одно из перспективных направлений в терапии АБП.

В клинике для угнетения продукции ФНО- α используют инфликсимаб, который представляет гибридные мышино-человеческие моноклональные антитела (IgG₁) к ФНО- α . Ингибирование активности ФНО- α применяют для лечения таких заболеваний, как ревматоидный артрит, болезнь Крона, псориаз, псориатический артрит. В недавних исследованиях был оценен эффект угнетения активности ФНО- α на течение воспалительных заболеваний печени, однако результаты противоречивы [7]. Так, по крайней мере в двух исследованиях, наблюдался благоприятный эффект ингибирования ФНО- α при алкогольном поражении печени у грызунов, а в группе из 20 пациентов с алкогольным стеатогепатитом инфликсимаб вызвал положительный эффект только в комбинации с преднизолоном [14]. Целью настоящей работы явилась оценка влияния инфликсимаба на развитие алкогольного поражения печени у крыс, вызванного длительным употреблением диеты Либера-ДеКарли, содержащей этанол.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В опыте использованы белые крысы-самки линии Вистар с начальной массой 200 – 220 г. Опытные животные в течение 10 недель содержались на жидкой этанолсодержащей диете (ЭСД) по Либера-ДеКарли (“Sniff Specialdiaten”, Germany) [6] со свободным доступом к корму. Углеводы в диете замещены изокалорийным количеством этанола, продуцирующего 36 % от общего количества энергии (50 г спирта на 1 кг дие-

¹ Отдел биохимической фармакологии (зав. — В. У. Буко) Государственное учреждение “Научно-производственный центр “Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси”, Гродненский филиал, 230030, Гродно, БЛК, 50, E-mail: pollyKir84@mail.ru

² УО “Гродненский государственный медицинский университет”, Республика Беларусь.

ты). Контрольные крысы получали стандартный рацион вивария. Все животные были разделены на 5 групп: 1-я — контроль вивария; 2-я — базовая диета, в которой этанол был изокалорийно замещён мальтодекстрином, 10 недель; 3-я — ЭСД, 10 недель; 4-я — ЭСД + инфликсимаб (1 мг/кг); 5-я — ЭСД + инфликсимаб (10 мг/кг). Инфликсимаб (Remicade, “Shering-Plough”, США) вводили внутривентриально в течение последних 10 дней опыта ежедневно в дозе 1 и 10 мг/кг массы тела в виде водного раствора. Дозы препарата и продолжительность лечения были подобраны в соответствии с особенностями обмена веществ у крыс на основании клинических и экспериментальных данных (в клинической практике доза инфликсимаба у человека составляет 5–10 мг/кг каждые 8 недель) [8, 14, 17]. Контрольные группы получали воду для инъекций в качестве плацебо. Экспериментальный протокол соответствовал международным стандартам проведения эксперимента с животными (European Communities Council Directive, 86/609/ЕЕС). По окончании эксперимента декапитацию животных проводили под тиопенталовым наркозом. В качестве объектов исследования использовали печень и кровь.

Для проведения гистологического исследования с помощью световой микроскопии часть образцов ткани печени фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина, часть замораживали в жидком азоте. Срезы из парафиновых блоков толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Криостатные срезы печени окрашивали суданом черным Б. Определение относительной площади суданофильной окраски срезов печени проводили с помощью компьютерного анализатора BIOSCAN — NT.

Активность аланин- и аспаргатаминотрансфераз (АЛТ и АСТ, соответственно) и уровень триглицеридов в печени определяли с помощью наборов фирмы “Lachema” (Czech Republic). Активность щелочной фосфатазы определяли с помощью наборов фирмы “Анализ-Х” (Беларусь).

Для оценки иммунологического статуса определяли фагоцитарную активность нейтрофилов крови (фагоцитарное число и фагоцитарный индекс) [2], гемолитическую активность комплемента (СН50 (активность комплемента по 50 % гемолизу) и Log₂ (логарифм разведения по двойному типу — максимальное разведение сыворотки, дающее полный гемолиз)) [3] и количество циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК)

[3]. В сыворотке крови и лимфоцитах печени, которые выделяли по методу А. Vouyou [4], исследовали уровень ФНО-α иммуноферментным методом с помощью наборов Quantikine ELISA Kit (R&D Systems GmbH, Германия).

Экспериментальные данные представлены в виде среднего арифметического (M) ± стандартная ошибка среднего арифметического (SEM). Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента, $p < 0,05$ рассматривали как статистически достоверное отличие.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У животных получавших базовую диету, отсутствовали явления стеатоза, отмечались единичные рассеянные лимфоидные элементы. Площадь суданофильной окраски у них была выше, чем у контрольных крыс, однако содержание триглицеридов в печени не отличалось от контрольного уровня (табл. 1).

У крыс, получавших ЭСД в течение 10 недель, в большинстве случаев отмечались выраженные явления стеатогепатита, характеризующиеся микровезикулярным стеатозом, диффузной и очаговой лимфоцитарной инфильтрацией с образованием нейтрофильных инфильтратов, ступенчатыми и очаговыми некрозами. Содержание триглицеридов печени у животных с хронической алкогольной интоксикацией было выше по сравнению с контрольными животными и крысами, получавшими базовую диету. Инфликсимаб в обеих дозах существенно улучшал гистологическую картину печени, снижая стеатоз и признаки воспаления. У животных, получавших исследуемый препарат, была снижена интенсивность стеатоза и лимфоидной инфильтрации, полностью отсутствовали некрозы. Инфликсимаб снижал площадь суданофильной окраски и содержание триглицеридов печени по сравнению с группой, получавшей ЭСД. При этом при введении препарата в дозе 10 мг/кг эти изменения были статистически достоверными.

Активность АЛТ и щелочной фосфатазы после скармливания ЭСД увеличивалась по сравнению с группой, получавшей базовую диету, тогда как активность АСТ увеличилась только по сравнению с контрольными животными. Инфликсимаб не оказал существенного влияния на активность АСТ и АЛТ только препарат в высокой дозе снизил достоверно активность щелочной фосфатазы (табл. 2).

Таблица 1. Относительная площадь суданофильной окраски срезов печени и содержание триглицеридов в ткани печени

Показатель	Контроль вивария	Базовая диета	ЭСД, 10 недель	ЭСД + инфликсимаб, 1 мг/кг	ЭСД + инфликсимаб, 10 мг/кг
Относительная площадь суданофилии, %	0,74 ± 0,27	2,84 ± 0,87 ^a	3,60 ± 0,79 ^a	2,98 ± 0,63 ^a	1,91 ± 0,72 ^c
Триглицериды печени, мг/100 г	1407 ± 33,08	1522 ± 44,21	2562 ± 160,8 ^{ab}	2297 ± 97,70 ^{ab}	2146 ± 77,81 ^{abc}

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 различия достоверны ($p < 0,05$): ^a — с контролем вивария; ^b — с базовой диетой; ^c — с ЭСД, 10 недель.

Уровень ФНО- α в сыворотке крови и лимфоцитах печени у животных, получавших ЭСД в течение 10 недель, двукратно превышал соответствующие показатели у животных, получавших базовую диету. Введение инфликсимаба в дозе 10 мг/кг привело к достоверному снижению концентрации этого провоспалительного цитокина в сыворотке, в то время как в лимфоцитах печени этот параметр под влиянием препарата в обеих дозах снижался до контрольного уровня (табл. 2).

У животных, получавших ЭСД, обнаружено снижение функциональной активности нейтрофилов крови, о чём свидетельствуют значения фагоцитарного числа и фагоцитарного индекса (табл. 3). У этих животных наблюдалась и активация системы комплемента, что отражалось в повышении СН50 и Log₂, в то же время количество ЦИК не изменилось. Применение инфликсимаба в обеих дозах приводило к увеличению функциональной активности нейтрофилов, в то время как активность комплемента понижалась до значений интактного контроля. При этом у животных, получавших инфликсимаб в дозе 10 мг/кг, отмечали повышение ЦИК (табл. 3).

Как свидетельствуют представленные гистологические данные, потребление жидкой ЭСД по Либеру-ДеКарли в течение 10 недель приводит к развитию микровезикулярного стеатоза и стеатогепатита. Результаты гистологического анализа находятся в соответствии с данными биохимических и иммунологических исследований: по мере увеличения продолжительности потребления диеты активируются маркерные ферменты сыворотки крови (АЛТ, АСТ, щелочная фосфатаза), возрастает содержание триглицеридов в печени, повышается уровень ФНО- α в сыворотке крови и в лимфоцитах печени, угнетается фагоцитарная актив-

ность нейтрофилов крови, активируется система комплемента.

Результаты нашего исследования согласуются с литературными данными о том, что хроническое употребление этанола приводит к патологическим изменениям в иммунной системе [11]. Ранее длительное употребление алкоголя связывали с иммуносупрессивным состоянием, о чем говорили нарушения клеточных и гуморальных иммунных реакций на различные антигены [10, 15]. Это подтверждается в проведенном нами исследовании снижением фагоцитарной активности нейтрофилов крови. Однако было показано, что хроническое потребление этанола может вызывать и парадоксальную активацию иммунной системы, последствием чего может быть развитие явления цитотоксичности [11]. В эти нарушения функционирования иммунной системы существенный вклад вносят цитокины, в частности, провоспалительный цитокин ФНО- α [11], что также согласуется с полученными нами результатами.

Инфликсимаб подтвердил свою эффективность в составе противовоспалительного препарата, снизив концентрацию ФНО- α в сыворотке и лимфоцитах печени. Следует отметить более высокую чувствительность измерения ФНО- α в лимфоцитах печени по сравнению с определением этого цитокина в сыворотке крови, что может найти своё применение в клинике в качестве маркера воспалительного состояния в биоптатах печени.

По сравнению с хорошо изученной ролью ФНО- α в воспалительном процессе при алкогольном поражении печени, его вклад в развитие алкогольного стеатоза менее охарактеризован. В экспериментах на мышах было продемонстрировано усиление развития алко-

Таблица 2. Активность маркерных ферментов сыворотки крови и концентрация ФНО- α в сыворотке крови и лимфоцитах печени

Показатель	Контроль вивария	Базовая диета	ЭСД, 10 недель	ЭСД + инфликсимаб, 1 мг/кг	ЭСД + инфликсимаб, 10 мг/кг
Щелочная фосфатаза, М. Е.	68,56 ± 11,64	142,6 ± 16,70 ^a	281,4 ± 34,1 ^{ab}	261,7 ± 15,03 ^{ab}	193,0 ± 16,23 ^{ac}
АЛТ, М. Е.	0,27 ± 0,02	0,32 ± 0,01 ^a	0,49 ± 0,02 ^{ab}	0,43 ± 0,03 ^{ab}	0,47 ± 0,02 ^{ab}
АСТ, М. Е.	0,69 ± 0,02	0,77 ± 0,05	0,89 ± 0,05 ^a	0,86 ± 0,06 ^a	0,87 ± 0,06 ^a
ФНО- α сыворотки, пг/мл	1,7 ± 0,25	3,1 ± 1,08	7,13 ± 0,58 ^{ab}	5,7 ± 0,53 ^a	4,35 ± 0,60 ^{ac}
ФНО- α лимфоцитов печени, пг/мл среды	4,16 ± 0,65	15,87 ± 2,19 ^a	30,82 ± 4,78 ^{ab}	3,26 ± 1,05 ^{bc}	6,62 ± 2,07 ^{bc}

Таблица 3. Показатели неспецифической клеточной и гуморальной резистентности организма

Показатель	Контроль вивария	Базовая диета	ЭСД, 10 недель	ЭСД + инфликсимаб, 1 мг/кг	ЭСД + инфликсимаб, 10 мг/кг
Фагоцитарный индекс, %	75,00 ± 2,30	65,86 ± 1,78 ^a	65,63 ± 2,46 ^a	78,38 ± 0,98 ^{bc}	79,13 ± 1,36 ^{bc}
Фагоцитарное число, у. е.	8,06 ± 0,35	6,96 ± 0,36 ^a	6,86 ± 0,28 ^a	8,73 ± 0,30 ^{bc}	9,10 ± 0,26 ^{abc}
Log ₂	3,38 ± 0,26	4,00 ± 0,19	4,44 ± 0,20 ^a	3,56 ± 0,18 ^c	3,50 ± 0,09 ^c
СН50, у. е.	56,36 ± 4,39	66,8 ± 3,16	74,11 ± 3,32 ^a	51,99 ± 7,01 ^c	58,45 ± 1,58 ^{bc}
ЦИК, у. е.	17,13 ± 1,64	12,00 ± 2,35	13,63 ± 3,09	18,25 ± 1,76	30,88 ± 6,84 ^{ab}

гольного стеатоза при “наработке” ФНО- α [16] и его предотвращение при блокировании рецептора ФНО- α [5]. Показано, что ФНО- α способен увеличивать экспрессию мРНК транскрипционного фактора SREBP-1c, вовлеченного в регуляцию экспрессии генов, кодирующих ферменты биосинтеза жирных кислот, в печени мышей и стимулировать образование SREBP-1 в гепатоцитах человека [12]. Кроме того, выяснено, что С3 компонент системы комплемента тоже вносит вклад в развитие стеатоза при хроническом употреблении алкоголя путем снижения уровня адипонектина и усиления транскрипции ферментов липогенеза, ацетил-КоА-карбоксилазы и синтетазы жирных кислот [13, 16]. Следовательно, снижение продукции ФНО- α и уменьшение активации системы комплемента может препятствовать развитию стеатоза.

ВЫВОДЫ

1. Инфликсимаб в дозе 10 мг/кг внутривенно более эффективен при лечении экспериментального алкогольного стеатогепатита у крыс по сравнению с дозой 1 мг/кг, т.к. наряду с иммуномодулирующим и противовоспалительным действием проявляет свойства гепатопротектора, уменьшая явления стеатоза в печени крыс.

2. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования антител к ФНО- α , в частности, инфликсимаба, для коррекции алкогольного стеатогепатита.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. В. Калинин, *Фарматека*, № 1, 48 – 54 (2005).
2. А. Н. Медведев, В. В. Чаленко, *Лаб. дело*, № 2, 19 – 20 (1991).
3. Д. К. Новиков, Н. Н. Новикова, *Оценка иммунного статуса: справочное издание*, Медицина, Москва-Витебск (1996).
4. A. Boyum, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **97**(29), 77 – 89 (1978).
5. C. Ji, N. Kaplowitz, Q. Deng, *Hepatology*, **40**(2), 442 – 451 (2004).
6. C. S. Lieber, L. M. DeCarli, *Methods in enzymology*, **233**, 585 – 594 (1994).
7. H. Tilg, A. M. Diehl, *New Engl J. Med.*, **343**, 1467 – 1476 (2000).
8. H. Tilg, A. Kaser, A. R. Moschen, *Liver International*, **26**, 1029 – 1039 (2006).
9. H. Tilg, C. P. Day, *Gastroenterology and Hepatology*, **4**, 24 – 34 (2007).
10. H. G. Adams, C. Jordan, *Med. Clin. North Am.*, **68**, 179 – 200 (1984).
11. I. N. D. Sherman, V. R. Preedy, R. R. Watson, *Ethanol and the Liver. Mechanisms and management*, Taylor & Francis, London and New York (2002).
12. M. Endo, H. Yoshimatsu, M. Seike, *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 614 – 621 (2007).
13. M. T. Pritchard, A. B. Stavitsky, M. R. McMullen, et al., *Gastroenterology*, **132**(3), 1117 – 1126 (2007).
14. R. Barbuio, M. Bertolo, M. Milanski, et al., *J. of Endocrinology*, **194**, 539 – 550 (2007).
15. R. R. MacGregor, *JAMA*, **256**, 1474 – 1479 (1986).
16. V. Purohit, B. Gao, B. J. Song, et al., *Alcohol Clin Exp Res.*, **33**(2), 191 – 205 (2009).
17. Z. Li, S. Yang, H. Lin, et al., *Hepatology*, **37**(2), 343 – 350 (2003).

Поступила 09.12.11

HEPATOPROTECTIVE AND IMMUNOMODULATORY EFFECTS OF INFLIXIMAB ON EXPERIMENTAL ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS

P. C. Kirvel¹, M. V. Goretskaya², O. Ya. Lukivskaya¹, E. E. Naruta¹, E. B. Belonovskaya¹, and V. U. Buko¹

¹ Institute of Pharmacology and Biochemistry (Grodno Division), National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, 230030 Belarus Republic

² Grodno State Medical University, ul. Gor'kogo 80, 230009, Grodno, Belarus Republic

* e-mail: pollyKir84@mail.ru

The effect of infliximab (1 and 10 mg/kg, i.p., during 10 days) on alcoholic steatohepatitis has been studied in rats fed with ethanol-containing liquid diet over 10 weeks. Both doses of infliximab showed immunomodulatory and anti-inflammatory effects, whereas only the maximum drug dose significantly decreased lipid accumulation in the liver. It can be concluded that infliximab (10 mg/kg) acts as an effective hepatoprotector, anti-inflammatory agent, and immunomodulator in rats with experimental alcoholic steatohepatitis.

Key words: Infliximab, alcoholic steatohepatitis, cytokines, tumor necrosis factor alpha, liver