

Diss. ETH No. 12462

**Reactive Oxygen Species and Tumor Necrosis
Factor in Drug-induced Hepatotoxicity**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH
for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by
Franziska Böss
Dipl. Natw. ETH

born February 26, 1969
citizen of Buchs (AG)

accepted on the recommendation of:
Prof. Dr. F. E. Würigler, examiner
PD Dr. U. A. Boelsterli, co-examiner

Zürich, 1997

Zusammenfassung

Das Zytokin Tumor Nekrosis Faktor (TNF) wird vom Körper unter anderem als Entzündungsmediator produziert. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) hingegen entstehen vorwiegend unabsichtlich bei der unvollständigen Reduktion von molekularem Sauerstoff, können jedoch auch durch TNF induziert werden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, das Verständnis für die Mechanismen zu erweitern, durch welche ROS und TNF an der Entstehung medikamenten-induzierter Leberschäden beteiligt sind. Drei Modelle medikamenten-vermittelter Lebertoxizität wurden untersucht: 1) Durch das Alzheimer-Medikament Tacrin (THA) hervorgerufene Toxizität in primären Leberzellkulturen und kultivierten Leberschnitten; 2) Durch das Antibiotikum Nitrofurantoin (NFT) induzierter oxidativer Stress und die daraus resultierenden Zellschäden in primären Leberzellkulturen der Maus; und 3) Acetaminophen(APAP)-induzierte Lebertoxizität in der Maus.

Die Zielsetzungen der einzelnen Untersuchungen und die daraus gewonnenen Erkenntnisse können wie folgt zusammengefasst werden:

1. Tacrin-induzierte Lebertoxizität *in vitro*

Ziel dieses Projektes war es, eine eventuelle Beteiligung von ROS an der *in vitro*-Toxizität von THA zu untersuchen. Überdies stellte sich die Frage, ob die Bioaktivierung des Medikamentes eine Voraussetzung für dessen zytotoxische Wirkung ist.

Charakteristisch für die *in vitro* Toxizität von THA sind 1) die Erfordernis hoher Konzentrationen zur Induktion von Zellschäden, sowohl in der primären Zellkultur als auch in kultivierten Leberschnitten, 2) ein spätes Einsetzen der Toxizität und 3) die nur geringen Unterschiede betreffend Ausmass der Schädigung in den verschiedenen untersuchten Spezies (Maus, Ratte, Krallenaaffe) und Mausstämmen. Es wurden keine Anzeichen für eine Beteiligung von ROS an der THA-induzierten Toxizität gefunden, weder mittels direkter Messung der Superoxid-Produktion noch mittels indirekter Untersuchungen. Dies lässt darauf schliessen, dass die THA-Toxizität nicht durch ROS verursacht wird. Das Ausmass der metabolischen Aktivierung von THA durch CYP1A2 hingegen korreliert mit dem Ausmass der Toxizität, und scheint deshalb von Bedeutung zu sein. Die beiden untersuchten Hauptmetabolite 1-OH-THA und 7-OH-THA sind jedoch weniger toxisch als die Muttersubstanz.

2. Durch Nitrofurantoin hervorgerufener oxidativer Stress *in vitro*

Kürzlich veröffentlichte Untersuchungen an Leberzellkulturen der Ratte haben gezeigt, dass durch oxidativen Stress verursachte Zellschäden durch Zugabe des Zuckers D-Tagatose weitgehend verhindert werden konnten. Der Mechanismus dieser Schutzwirkung wurde am Modell der NFT-induzierten oxidativen Zellschädigung näher untersucht. Unsere Studien an primären Leberzellkulturen der Maus zeigten, dass die NFT-induzierte Superoxid-Produktion in Anwesenheit von D-Tagatose zwar unverändert bleibt, die daraus resultierende Oxidation von kritischen Makromolekülen, wie Lipiden und Proteinen, jedoch weitgehend verhindert wird. Wir schliessen daraus, dass die antioxidative Schutzwirkung von D-Tagatose erst nach der Entstehung der primären ROS-Spezies - in diesem Falle Superoxid - zu Stande kommt. Unsere Daten deuten darauf hin, dass die Verminderung der eisen-katalysierten Bildung von Hydroxylradikalen die Ursache für den durch D-Tagatose hervorgerufenen Schutz sein könnte.

3. Acetaminophen-induzierte Lebertoxizität in Mäusen

Es gibt reichlich Hinweise darauf, dass Lebermakrophagen (Kupfferzellen) und andere nichtparenchymale Zellen, durch die Produktion von cytotoxischen Mediatoren an der Entstehung der APAP-Toxizität beteiligt sind. Als mögliche Mediatoren gelten auch ROS und TNF. Um die diesbezügliche Wichtigkeit von TNF zu untersuchen, wurde die APAP-Toxizität in TNF/LT α defizienten Mäusen mit derjenigen in normalen Wildtyp-Tieren verglichen. Sowohl die Wildtyp- als auch die TNF/LT α -defizienten Tiere entwickelten als Folge der APAP-Behandlung vergleichbare, schwere Leberschäden. Nach der Verabreichung hepatotoxischer APAP-Dosen konnte in Wildtyp-Tieren weder ein Anstieg der TNF-Protein-Konzentration im Serum noch eine Zunahme der TNF-mRNA-Transkripte in der Leber nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse weisen eindeutig darauf hin, dass TNF kein essentieller Mediator der APAP-induzierten Lebertoxizität ist.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die *in vitro* Tacrin-Toxizität nicht von der ROS-Produktion, jedoch von der Bioaktivierung durch CYP1A2 abhängt. Die Nitrofurantoin-induzierte Leberzellschädigung hingegen ist eindeutig ROS-vermittelt, wobei Eisen bei der Oxidation von Makromolekülen eine zentrale Rolle einzunehmen scheint. Was die Lebertoxizität von Acetaminophen betrifft, so konnte gezeigt werden, dass diese nicht durch TNF vermittelt ist.

Summary

Reactive oxygen species (ROS) and the cytokine tumor necrosis factor (TNF) are molecules produced by the body either to exert a specific function or, in the case of ROS, as unintentional by-products from incomplete reduction of molecular oxygen. The objective of the present work was to gain a better understanding of the mechanisms by which ROS and TNF, which itself can be an inducer of ROS, are implicated in drug-induced liver injury. Three different models of drug-induced liver damage were used: 1) toxicity of the Alzheimer's drug tacrine (THA) towards primary mouse hepatocyte cultures and precision cut liver slices 2) oxidative stress-mediated cellular damage in primary mouse hepatocyte cultures induced by the antibiotic drug nitrofurantoin (NFT); and 3) acetaminophen(APAP)-induced liver toxicity in mice.

The objectives and main findings of these three models can be summarized as follows:

1. Tacrine-induced hepatotoxicity *in vitro*

The aim of this study was to evaluate whether ROS are involved in THA toxicity *in vitro* and whether cellular damage in precision cut liver slices and in primary mouse hepatocyte cultures induced by high doses of THA requires bioactivation of the drug.

In vitro THA toxicity was characterized by 1) the need of high concentrations to induce cellular damage in hepatocyte cultures and liver slices, 2) a late onset of toxicity, and 3) only little differences in the susceptibility of the different species (mice, rats, marmoset monkeys) and mouse strains used. No evidence for the involvement of ROS formation in tacrine-associated hepatocellular injury was found, neither by direct measures of superoxide anion formation nor by indirect evaluations. Therefore, ROS are unlikely to play a major role in the acute hepatocyte injury provoked by tacrine. Using primary mouse hepatocyte cultures we demonstrated that the extent of metabolic activation of tacrine by CYP1A2 was predictive of the severity of the ensuing cellular injury but that the two major metabolites of THA, 1-OH-THA and 7-OH-THA, are less toxic than the parent compound.

2. Nitrofurantoin-induced oxidative stress in the murine hepatocyte culture

Recent findings have shown that the sugar D-tagatose was able to prevent oxidative stress-mediated cellular damage in rat hepatocyte culture. The model of NFT-induced oxidative stress in primary mouse hepatocyte culture was used to more closely investigate the mechanism by which D-tagatose affords protection against ROS-mediated cell damage. Our results demonstrate that 1) the NFT-induced formation of superoxide anion is unaltered and 2) ROS-induced oxidation of critical macromolecules is largely prevented in the presence of D-tagatose. We conclude that D-tagatose protects cells from oxidative stress at a site distal to the formation of superoxide anion radicals. In addition, we provide ample evidence that the iron-catalyzed formation of hydroxyl radicals is a key target for the antioxidant intervention by this ketohexose.

3. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice

Mediators, e.g. ROS or the cytokine tumor necrosis factor (TNF), released from resident liver macrophages (Kupffer cells) have been suggested to be involved in APAP hepatotoxicity. To evaluate whether TNF and the closely related lymphotoxin α (LT- α) are of importance in this model of liver injury, APAP-toxicity in mice deficient in TNF and LT- α was compared to that in wild type mice. Wild type and TNF/LT- α deficient mice developed severe and comparable liver damage in response to APAP. In addition, there was no increase in serum levels of TNF protein or TNF mRNA transcripts in the liver of wild type mice upon treatment with a hepatotoxic dose of APAP. These findings strongly suggest that TNF is not a key mediator of early APAP-induced hepatotoxicity.

Taken together, we found that tacrine toxicity *in vitro* is not mediated *via* oxidative stress but dependent on CYP1A2 metabolism. Nitrofurantoin induced liver cell damage, in contrast, is ROS-mediated and iron turned out to be a crucial mediator of this NFT-induced oxidative stress and a key target for its prevention. Concerning acetaminophen-induced liver injury, we have shown that TNF is not the major mediator of hepatotoxicity.