

Исследование нейротоксичности парацетамола и его метаболита NAPQI (краткое сообщение)

Ю.А.Власова¹, доцент кафедры биологической и общей химии СЗГМУ им. И.И. Мечникова, кандидат биологических наук, ORCID 0000-0001-5536-3595,

Н.Э.Голованова^{1,2}, доцент медицинского факультета СПбГУ и кафедры биологической и общей химии СЗГМУ им. И.И. Мечникова, кандидат биологических наук, ORCID 0000-0001-9286-8787,

Ч.Р.Бейшебаева¹, старший преподаватель кафедры биологической и общей химии СЗГМУ им. И.И. Мечникова, ORCID 0000-0002-9245-6261,

К.А.Загородникова¹, ведущий научный сотрудник ЦНИЛ СЗГМУ им. И.И. Мечникова, кандидат медицинских наук, PhD Каролинского института, ORCID 0000-0002-5251-5319,

М.Н.Соколова¹, доцент кафедры биологической и общей химии СЗГМУ им. И.И. Мечникова, кандидат биологических наук, ORCID 0000-0002-6266-4342,

В.А.Дадали¹, профессор кафедры биологической и общей химии СЗГМУ им. И.И. Мечникова, доктор химических наук, ORCID 0000-0002-1404-9396,

Ж.В.Антонова¹, доцент кафедры биологической и общей химии СЗГМУ им. И.И. Мечникова, кандидат биологических наук, ORCID 0000-0003-1789-2503

¹ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, 195067, Россия, Санкт-Петербург, Пискаревский проспект, 47, пав. 5;

²Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Россия, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

E-mail: Yuliya.Vlasova@szgmu.ru

Резюме. Несмотря на достаточно полно изученные аспекты эффективности и безопасности парацетамола (ацетаминофен, АПАР), до сих пор отсутствует единое мнение в отношении негативного действия препарата на центральную нервную систему. В качестве подтверждения приводятся результаты ретроспективных исследований, в которых изучалась возможная связь приема парацетамола женщинами во время беременности с возникновением аутизма и задержки психоэмоционального развития у родившихся детей. Такого рода исследования зачастую встречают серьезную критику, так как возникает много вопросов к методам оценки нарушений поведения и обработке результатов исследований. Поэтому экспериментальные данные, полученные на нейрональных клетках, могут стать достаточным основанием для того, чтобы подтвердить или опровергнуть предположения о нейротоксичности парацетамола. Цель нашего исследования – изучение влияния парацетамола и его метаболита NAPQI на клетки нейрональной линии PC12 в сравнении с воздействием на нейроны коры мозга эмбрионов крыс в условиях окислительного стресса, индуцированного 0,3 мМ перекиси водорода. Исследование влияния парацетамола и его метаболита NAPQI на жизнеспособность клеток проводилось методом, основанным на восстановлении бромидов 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия (МТТ-метод). Показано, что при преинкубации нейронов коры мозга крыс с парацетамолом в концентрации 1 мг/мл в течение 24 ч и последующей инкубации с 0,3 мМ перекиси водорода как перекись водорода, так и сам парацетамол снижают жизнеспособность нейронов. Совместная инкубация с парацетамолом и перекисью водорода также уменьшает жизнеспособность нейронов. Тот же эффект парацетамола и его метаболита наблюдается при совместной преинкубации парацетамола или NAPQI и перекиси водорода. Таким образом, на обеих моделях получили результаты, свидетельствующие о нейротоксическом действии парацетамола и его метаболита NAPQI. Кроме того, данное исследование позволило сравнить две модели для изучения нейротоксичности. Использование нейрональной линии PC12 является хорошей альтернативой экспериментам на нейронах коры мозга эмбрионов крыс. Несомненными достоинствами линии PC12 являются простота культивирования, быстрый рост клеток, возможность получения большого количества материала для исследования.

Ключевые слова: нейроны, линия PC12, парацетамол, NAPQI

Для цитирования: Власова Ю.А., Голованова Н.Э., Бейшебаева Ч.Р., Загородникова К.А., Соколова М.Н., Дадали В.А., Антонова Ж.В. Исследование нейротоксичности парацетамола и его метаболита NAPQI (краткое сообщение). *Лабораторные животные для научных исследований*. 2021; 4: 82–86. <https://doi.org/10.29296/2618723X-2021-04-09>

Study of neurotoxicity of paracetamol and its metabolite NAPQI (short message)

Yu.A. Vlasova¹, ORCID 0000-0001-5536-3595
N.E. Golovanova^{1,2}, ORCID 0000-0001-9286-8787
Ch.R. Beishebaeva¹, ORCID 0000-0002-9245-6261
K.A. Zagorodnikova¹, ORCID 0000-0002-5251-5319
M.N. Sokolova¹, ORCID 0000-0002-6266-4342
V.A. Dadali¹, ORCID 0000-0002-1404-9396
Zh.V. Antonova¹, ORCID 0000-0003-1789-2503
¹North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov,
195067, Russia, St. Petersburg, Piskarevskij Prospekt, 47, pav. 5;
²St Petersburg State University,
199034, Russia, St Petersburg, 7–9 Universitetskaya Emb.
E-mail: Yuliya.Vlasova@szgmu.ru

Abstract. Despite a fairly complete study of the efficacy and safety aspects of paracetamol (acetaminophen, APAP), there is still no consensus regarding the negative effect of the drug on the central nervous system. The results of retrospective studies evident the possible connection between the intake of paracetamol by women during pregnancy with the development of autism and delayed psycho-emotional development in newborn children. This research often meet with serious criticism, as many questions arise about the methods for assessing behavior disorders and the processing of research results. Therefore, the experimental data obtained on neuronal cells may become a sufficient basis to confirm or refute the assumptions about the neurotoxicity of paracetamol. The aim of our research is to study the effect of paracetamol and its metabolite NAPQI on cells of the PC12 neuronal line in comparison with the effect on the neurons of the cerebral cortex of rat embryos under conditions of oxidative stress induced by 0.3 mM hydrogen peroxide. The study of the effect of paracetamol and its metabolite NAPQI on cell viability was carried out by a method based on the reduction of 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-tetrazolium bromide (MTT method). It was shown that neurons of the rat cerebral cortex preincubation with 1 mg/ml of paracetamol for 24 hours and subsequent incubation with 0,3 mM hydrogen peroxide, both hydrogen peroxide and paracetamol itself reduce the viability of neurons. Co-incubation with paracetamol and hydrogen peroxide also reduces the viability of neurons. The same effect of paracetamol and its metabolite is observed during preincubation of paracetamol or NAPQI and hydrogen peroxide. Thus, in both models, we obtained results indicating the neurotoxic effect of paracetamol and its metabolite NAPQI. In addition, this study compared the two models for studying neurotoxicity. The use of the PC12 neuronal line is a good alternative to experiments on neurons of the cerebral cortex of rat embryos. The absolutely advantages of the PC12 line are the simplicity of cultivation, rapid cell growth, and the possibility of obtaining a large amount of material for research.

Key words: neurons, PC12 line, paracetamol, NAPQI.

For citation: Vlasova Yu.A., Golovanova N.E., Beishebaeva Ch.R., Zagorodnikova K.A., Sokolova M.N., Dadali V.A., Antonova Zh.V. Study of neurotoxicity of paracetamol and its metabolite NAPQI (short message). *Laboratory Animals for Science*. 2021; 4: 82–86. <https://doi.org/10.29296/2618723X-2021-04-09>

Введение

Парацетамол (ацетаминофен, АРАР) – один из самых распространенных препаратов, широко назначаемых как жаропонижающее средство. Среди всех жаропонижающих лекарственных средств только парацетамол и ибупрофен рекомендованы к использованию в педиатрической практике, поскольку полностью отвечают критериям высокой терапевтической эффективности и безопасности [1, 2]. Тем не менее высказываются предположения о его возможной нейротоксичности. Имеются некоторые данные о связи приема препарата беремен-

ными женщинами с рождением у них детей с аутизмом [3]. Точный механизм предполагаемой связи не ясен. Обсуждается несколько предположений: во-первых, у детей, склонных к аутизму, нарушен процесс сульфатирования парацетамола, что приводит к увеличению его концентрации, несмотря на использование терапевтической дозы; во-вторых, активация каннабиноидной системы может приводить к развитию аутизма у детей, принимающих парацетамол [4]; в-третьих, уязвимость к окислительному стрессу также может быть фактором, приводящим к развитию расстройства аутического спектра [5]. Показано, что парацетамол вызывает

когнитивные нарушения и изменения количества нейротропного фактора мозга (BDNF) у мышей в разных областях мозга [5]. Опубликованы данные, свидетельствующие о том, что парацетамол способен существенно увеличивать экспрессию JNK, NIF1A, CASP3 – маркеров апоптоза клеток в сфероидных клетках человеческой глиобластомы A172 [6]. В ранее проведенных экспериментах показано, что в концентрации 1 и 2 мМ АРАР увеличивает гибель клеток нейрональной линии РС12 [7, 8].

Цель данного исследования – изучить влияние парацетамола и его метаболита NAPQI на клетки нейрональной линии РС12 в сравнении с воздействием на нейроны коры мозга эмбрионов крыс Wistar в условиях окислительного стресса, индуцированного 0,3 мМ перекиси водорода.

Материал и методы

В экспериментах использовали перекись водорода, ацетаминофен, цитозин-β-D-арабинозидфуранозид, поли-D-лизин (Sigma-Aldrich, США); среда инкубации DMEM с L-глутамином, сыворотка плодов коровы, трипсин, пенициллин и стрептомицин (Биолот, Россия).

Клетки линии РС12 – феохромоцитомная линия, происходящая из адренергических нейронов мозгового вещества надпочечников крыс линии New England Deaconess. При культивировании в стандартной среде количество клеток РС12 удваивается в течение 48 ч. Данная клеточная линия широко используется в нейробиологических исследованиях, так как проявляет нейрональные свойства и является удобной моделью для изучения процессов, происходящих в клетках нервной системы как на клеточном, так и на молекулярном уровне. Также она характеризуется простотой культивирования. опыты проводили на культуре нейрональной клеточной линии РС12 (ATCC) в инкубаторе при 5% CO₂ и температуре 37°C. Клетки выращивали в питательной среде инкубации DMEM с L-глутамином, содержащей 10% сыворотки крови плодов коровы и 5% сыворотки крови лошади, 25 мкг/мл пеницилина и 25 ед/мл стрептомицина. Среду меняли каждые 2–3 дня. Клетки РС12 переносили из чашек Петри, в которых их выращивали, в планшеты. Количество клеток в 96-луночных планшетах составило 4.105 клеток в лунке. Эксперименты начинали через 24 ч после посева клеток в планшеты. В опытах применяли среду DMEM с глутамином, не содержащую сыворотки.

Эксперименты на животных проводили в полном соответствии с директивой Европейского Совета по соблюдению этических принципов в работе с лабораторными животными (The European Council Directive (86/609/EEC)) и директивой

2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза. Для проведения исследования были использованы эмбрионы, полученные от 2 самок крыс Wistar. Животные, получены из питомника лабораторных животных «Рапполово» (ФГУП ПЛЖ «Рапполово» РАН). В период спаривания и беременности самок содержали в стандартных условиях вивария. Температура воздуха соответствовала 20–24°C, влажность – 45–65%, световой режим – 12 ч свет/12 ч темнота. Во время беременности животных содержали в индивидуальных клетках. Самки крыс получали стандартный гранулированный корм «Полнораационный экструдированный комбикорм ПК-120 для лабораторных животных (крыс, мышей)», производство ООО «Лабораторкорм» (Россия), ad libitum в кормовое углубление клеток, воду также ad libitum. Эвтаназию самок осуществляли передозировкой анестетиков. Нейроны выделяли из коры мозга 8 эмбрионов крыс на 17–18-й день развития, как описано ранее [7]. Для выделения клеток применяли трипсин, для предотвращения размножения глиальных клеток использовали цитозин-β-D-арабинозидфуранозид. Нейроны выращивали в полной ростовой среде, состоящей из DMEM, содержащей 10% F12, 10% сыворотки крови плодов коровы, 2 мМ L-глутамин и 20 мМ Neres. Нейрональные клетки, выделенные из коры мозга, высевали в полной ростовой среде в 96-луночные планшеты, покрытые поли-D-лизином, в количестве 4.105 клеток в лунке; на следующий день клетки обрабатывали 1 мкМ цитозин-β-D-арабинофуранозидом, через 24 ч меняли полную ростовую среду на свежую. Эксперименты начинали на 5–6-й день культивирования клеток in vitro.

Определение жизнеспособности клеток выполняли методом, основанным на восстановлении МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид) [8]. Клетки высевали в 96-луночные планшеты в концентрации 5.104 клеток в лунке, через 24 ч меняли полную ростовую среду на среду DMEM с L-глутамином. Клетки инкубировали с парацетамолом в концентрации 1 мг/мл или NAPQI (0,1 мг/мл) в течение 24 ч. За 2,5 ч до конца инкубации добавляли 0,3 мМ перекиси водорода. Реагент МТТ добавляли в конечной концентрации 0,5 мг/мл за 2 ч до окончания инкубации. Через 2 ч клетки лизировали с 20% SDS в растворе 50% диметилформамида в 0,05 н. HCl. Содержание окрашенного продукта реакции (МТТ-формаза) измеряли путем определения оптической плотности при 570 нм на микропланшетном ридере. Результаты выражали в процентах от контроля. Контролем служили клетки РС12, которые не подвергались действию парацетамола, NAPQI и перекиси водорода.

Содержание МТТ-формаза в них принимали за 100%.

Результаты и обсуждение

В ходе проведенного исследования для определения влияния парацетамола на нервную систему были использованы модели *in vitro* и *in vivo*. Токсическое действие парацетамола и его метаболита NAPQI показано на культуре клеток PC12 и на нейронах коры мозга эмбрионов крыс Wistar.

Сравнение результатов исследований демонстрирует следующее. Преинкубация с 0,3 мМ перекиси водорода снижает процент выживших клеток, при этом не только нейронов (51,5%), но и клеток PC12 (63,8%); с 1 мг/мл парацетамола или 0,1 мг/мл NAPQI также наблюдается снижение числа выживших клеток (85,2 и 73,4% – парацетамол и 85,6 и 64,0% – NAPQI соответственно). При совместной инкубации парацетамола или его метаболита с перекисью водорода уменьшение количества выживших клеток составило 52,8 и 58,1% в первом случае и 52,8 и 61,8% – во втором соответственно.

Таким образом, на обеих моделях показан сходный по выраженности токсический эффект исследуемых веществ. Полученные результаты требуют проведения дополнительных исследований для подтверждения нейротоксического действия парацетамола и изучения его механизма.

Заключение

Полученные данные могут свидетельствовать о возможном токсическом эффекте парацетамола и его метаболита NAPQI, влияющем на нервную ткань.

Кроме того, данное исследование дало возможность сравнить две модели для изучения нейротоксичности (*in vivo* и *in vitro*). Установлено, что использование нейрональной линии PC12 является хорошей альтернативой экспериментам на нейронах коры мозга эмбрионов крыс. При этом за относительно короткий срок можно получить большое количество материала для исследований, что является огромным преимуществом, так как для проведения экспериментов *in vivo* необходим длительный срок подготовки (период спаривания, 17–18 дней гестации и 7 дней культивирования клеток до начала эксперимента). В случае применения клеточной линии PC12 нет необходимости использовать лабораторных животных, что позволяет в полной мере реализовать принципы «3Rs».

Вклад авторов

Ю.А. Власова – идея, управление и координация планирования и выполнения исследовательской работы.

Н.Э. Голованова – выполнение экспериментальной работы (*in vivo*), сбор и анализ данных.

Ч.Р. Бейшебаева – выполнение экспериментальной работы (*in vitro*), сбор и анализ даны.

К.А. Загородникова – методология, сбор и анализ данных, написание текста статьи.

М.Н. Соколова – анализ данных литературы, написание текста.

Ж.В. Антонова – анализ данных литературы, редактирование текста.

В.А. Дадали – существенный вклад в концепцию работы, административное сопровождение проекта, просмотр и редактирование текста статьи.

Сведения о конфликте интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Author's Contribution

Vlasova Yu.A. – elaboration of the idea of the study, management and coordination of planning and implementation of the stud.

Golovanova N.E. – experimental work (*in vivo*); collection, analysis of data.

Beishebaeva Ch.R. – experimental work (*in vitro*); collection, analysis of data.

Zagorodnikova K.A. – methodology, realization, data collection and analysis, writing-original the text of the article.

Sokolova M.N. – analysis of scientific literature, writing the text.

Antonova Zh.V. – analysis of scientific literature, revising the text.

Dadali V.A. – a substantial contribution to the elaboration of the study concept, administrative support of the project, viewing and editing the text of the article.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Литература

1. Таранушенко Т.Е., Панфилова В.Н. Лихорадка у детей с респираторными вирусными инфекциями: эффективная и безопасная помощь. Вопросы современной педиатрии. – 2013. – 12(5). – С. 54-59. [Taranushenko TE, Panfilova VN. Fever in children with respiratory viral infections: effective and safe methods of treatment. *Voprosy sovremennoi pediatrii = Current Pediatrics*. – 2013. – 12(5). – С. 54-59 (In Russ.)]

2. Крышень К.Л., Мошков А.Е., Демяновский М.Н., Ковалева М.А. Экспериментальное исследование фармакологической безопасности лекарственных средств, применяемых для купирования лихорадочного синдрома в детском возрасте. Безопасность и риск фармакотерапии. – 2020. –8(3). – С. 151-159.

[Kryshen' KL, Moshkov AE, Demyanovskii MN, Kovaleva MA. Eksperimental'noe issledovanie farmakologicheskoi bezopasnosti lekarstvennykh sredstv, primenyaemykh dlya kupirovaniya likhoradochnogo sindroma v detskom vozraste. Bezopasnost' i risk farmakoterapii. – 2020. – 8(3). – С. 151-159. (In Russ.)].

3. Avella-Garcia C., Julvez J., Fortuny J. et al. Acetaminophen use in pregnancy and neurodevelopment: attention function and autism spectrum symptoms // *Int J of Epidemiology*. – 2016. – Vol.45 (6). – P. 1987-1996. DOI:10.1093/ije/dyw115. Kennon-McGill S., McGill M.R. Extrahepatic toxicity of acetaminophen: critical evaluation of the evidence and proposed mechanisms // *J Clin Transl Res*. – 2017. – Vol. 18 №3(3). – P.297-310. DOI: 10.18053/jctres.03.201703.005.

4. Schultz S., DeSilva M., Gu T., Qiang M., Whang K. Effects of the Analgesic Acetaminophen (Paracetamol) and its para-Aminophenol Metabolite on Viability of Mouse-Cultured Cortical Neurons // *Basic Clinical Pharmacol Toxicol*. – 2012. – Vol.110 (2). – P.141-144. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2011.00767.x.

5. Aleksandrova V., Senyavina N. V., Maltseva D. V., Khutornenko A. A., Sakharov D. A. p53- and Caspase-3-Independent Mechanism of Acetaminophen Effect on Human Neural Cells // *Bull of Exp Biol Med*. – 2016. – Vol. 160(6). – P.763-766. DOI: 10.1007/s10517-016-3304-7.

6. Власова Ю.А., Загородникова К.А., Иванова И.С., Чухно А.С. Влияние окислительного стресса на нейротоксический эффект ацетаминофена // *Бутлеровские сообщения*. – 2019. – Т. 59 (9). – С.106-

109. [Vlasova Yu.A., Zagorodnikova K.A., Ivanova I.S., Chukhno A.S. Vliyaniye okislitel'nogo stressa na neurotoksicheskii ehffekt atsetaminofena // *Butlerovskie soobshcheniya*. – 2019. – Т. 59 (9). – P.106-109 (in Russ.)].

7. Власова Ю.А., Загородникова К.А., Гайковская Л.Б. Ацетаминофен (парацетамол) в высоких концентрациях снижает жизнеспособность клеток PC12. Профилактическая медицина – 2019: сб науч трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием / под ред. А.В. Мельцера, И.Ш. Якубовой. – СПб: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2019. – С. 110-115. [Vlasova Yu.A., Zagorodnikova K.A., Gaikova L.B. Atsetaminofen (paratsetamol) v vysokikh kontsentratsiyakh snizhaet zhiznesposobnost' kletok PC12. Profilakticheskaya meditsina – 2019: sb nauch trudov Vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem / pod red. A.V. Mel'tsera, I.SH. Yakubovoi. – Spb: Izd-vo SZGMU im. I.I. Mechnikova, 2019. – P. 110-115 (in Russ.)].

8. Mironova E.V., Evstratova A.A., Antonov S.M. A fluorescence vital assay for the recognition and quantification of excitotoxic cell death by necrosis and apoptosis using confocal microscopy on neurons in culture // *J Neurosci Methods*. – 2007. – Vol.163(1). – P.1-8. DOI:10.1016/j.jneumeth.2007.02.010.

9. Avrova N.F., Sokolova T.V., Vlasova Y.A. et al. Protective and Antioxidative Effects of GM1 Ganglioside in PC12 Cells Exposed to Hydrogen Peroxide are Mediated by Trk Tyrosine Kinase // *Neurochem Res*. – 2010. – Vol. 35(1). – P.85–98. DOI: 10.1007/s11064-009-0033-6