

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ АЦЕТАМИНОФЕНА

Зудова А.И., Мухлынина Е.А., Соломатина Л.В.

ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук,
г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Ацетаминофен является одним из наиболее токсичных препаратов, при передозировке которыми развивается повреждение печени. При этом ацетаминофен-индуцированная печеночная недостаточность тесно связана с развитием синдрома системной воспалительной реакции. При этом на сегодняшний день нет лекарственного средства, направленного на подавление системного воспалительного ответа. То есть требуется изучение данного вопроса в эксперименте, однако удобная и воспроизводимая модель системного воспаления при отравлении ацетаминофеном на настоящий момент не получена. Поэтому было принято решение разработать экспериментальную модель системного воспаления при отравлении ацетаминофеном. Целью данного исследования стало экспериментально обосновать полулетальную дозу при отравлении ацетаминофеном у мышей линии C57Bl/6, оценить показания гематологического и биохимического анализов крови после введения препарата. Исследование проводилось на мышцах-самцах линии C57Bl/6. Для определения полулетальной дозы экспериментальным животным внутрибрюшинно вводили «Ифимол» (Unique Pharmaceutical Laboratories, Индия) или раствор ацетаминофена (Sigma-Aldrich, США) с концентрацией 14 мг/мл в разных дозах. При введении «Ифимола» выхода на полулетальную дозу достичь не удалось. При введении раствора ацетаминофена, разведенного в физиологическом растворе в концентрации 14 мг/мл, 50% летальность была зафиксирована при введении дозы 600 мг/кг массы тела. После установления полулетальной дозы экспериментальной группе мышей вводили раствор ацетаминофена (Sigma-Aldrich, США) с концентрацией 14 мг/мл в дозе 600 мг/кг. Контрольной группе вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме. На вторые сутки проводили забор образцов печени, взятие периферической крови из бедренной артерии. В дальнейшем был проведен гематологический и биохимический анализы крови, гистологический анализ с оценкой общей патоморфологической картины. При проведении гистологического исследования с окраской гематоксилин/эозин были выявлены центролобулярные некрозы, дезорганизация структуры печени. По данным биохимического анализа крови статистически достоверно ($p < 0,05$) различались активность аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, концентрация креатинина, значение коэффициента де Ритиса у эксперименталь-

Адрес для переписки:

Зудова Алевтина Игоревна
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук
620078, Россия, г. Екатеринбург,
ул. Первомайская, 106.
Тел./факс: 8 (343) 374-00-70.
E-mail: tina.zudova@mail.ru

Address for correspondence:

Alevtina I. Zudova
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch,
Russian Academy of Sciences
106 Pervomayskaya St
Yekaterinburg
620078 Russian Federation
Phone: +7 (343) 374-00-70.
E-mail: tina.zudova@mail.ru

Образец цитирования:

А.И. Зудова, Е.А. Мухлынина, Л.В. Соломатина
«Экспериментальная модель системного воспаления
при токсическом воздействии ацетаминофена»
// Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27,
№ 3. С. 421-426.
doi: 10.46235/1028-7221-16654-ЕМО

© Зудова А.И. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.I. Zudova, E.A. Mukhlynina, L.V. Solomatina
“Experimental model of systemic inflammation during
acetaminophen toxicity”, Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 3,
pp. 421-426.
doi: 10.46235/1028-7221-16654-ЕМО

© Zudova A.I. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16654-ЕМО

ной группы по сравнению с контрольной. Среди показателей гематологического анализа крови статистически значимые различия были по количеству лейкоцитов, тромбоцитов, а также абсолютному и относительному содержанию гранулоцитов и лимфоцитов. Таким образом, через 48 часов после введения полулетальной дозы ацетаминофена отмечались признаки повреждения внутренних органов (печень, почки), изменения показателей иммунной системы, что аналогично компонентам системного воспаления у людей.

Ключевые слова: ацетаминофен, парацетамол, отравление, системное воспаление, экспериментальная модель, мыши

EXPERIMENTAL MODEL OF SYSTEMIC INFLAMMATION DURING ACETAMINOPHEN TOXICITY

Zudova A.I., Mukhlynina E.A., Solomatina L.V.

Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. Acetaminophen is one of the most toxic drugs that can cause liver damage. At the same time, acetaminophen-induced liver failure is closely associated with the development of systemic inflammatory response syndrome. However, there is no drug aimed at suppressing the systemic inflammatory response. That is, this issue needs to be studied experimentally, but a model of systemic inflammation during acetaminophen overdose has not yet been obtained. Therefore, it was decided to develop an experimental model of systemic inflammation during acetaminophen overdose. The purpose of this study was to experimentally substantiate the semi-lethal dose for acetaminophen overdose in C57Bl/6 mice and to evaluate the readings of blood tests after administration of the drug. To determine the semi-lethal dose, male C57Bl/6 mice were intraperitoneally injected with “Ifimol” (Unique Pharmaceutical Laboratories, India) or acetaminophen solution (Sigma-Aldrich, USA) with a concentration of 14 mg/ml in different doses. When introducing “Ifimol”, it was not possible to achieve a semi-lethal dose. When administering a solution of acetaminophen, 50% mortality was recorded at a dose of 600 mg/kg body weight. After establishing a semi-lethal dose, the experimental group was administered an acetaminophen solution (Sigma-Aldrich, USA) with a concentration of 14 mg/ml at a dose of 600 mg/kg. The control group was injected with saline in an equivalent volume. On the second day, liver and peripheral blood samples were taken. Subsequently, hematological and biochemical blood tests and histological analysis were performed. Histological examination revealed centrilobular necrosis and disorganization of the liver structure. According to the biochemical blood test, the activity of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, creatinine concentration, and the de Ritis coefficient differed statistically significantly ($p < 0.05$) in the experimental group compared to the control group. Among the hematological blood test parameters, there were statistically significant differences in the number of leukocytes, platelets, as well as the absolute and relative content of granulocytes and lymphocytes. Thus, 48 hours after administration of a semi-lethal dose of acetaminophen, there were signs of damage to internal organs (liver, kidneys) and changes in immune system parameters, which are similar to components of systemic inflammation in humans.

Keywords: acetaminophen, paracetamol, poisoning, systemic inflammation, immunology, experimental model, mice

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (Грант № 24-25-00469).

Введение

Ацетаминофен (парацетамол, N-ацетил-параминофен) — нестероидное противовоспалительное средство, один из наиболее широко используемых анальгезирующих и антипиретических препаратов в мировой клинической прак-

тике. Острое токсическое повреждение печени ацетаминофеном относится к числу актуальных клинических проблем, а также широко используется в экспериментальной токсикологической практике.

Ацетаминофен-индуцированная острая печеночная недостаточность у пациентов тесно связана с развитием синдрома системной воспалительной реакции (ССВО) и последующим каскадом осложнений, включая печеночную

энцефалопатию (ПЭ), коагулопатию и синдром полиорганной дисфункции. В работе Craig и соавт. [2] показано, что развитие системного воспалительного ответа, на фоне индуцированной ацетаминофеном гепатотоксичности, было связано с наиболее неблагоприятным исходом, независимо от наличия инфекции.

В лаборатории иммунологии воспаления ИИФ УрО РАН под руководством Гусева Е.Ю. и Черешнева В.А. многие годы ведутся работы по изучению системного воспаления как типового патологического процесса на основании большого клинического материала. Разработаны шкалы для верификации острого и хронического вариантов системного воспаления в клинической практике [14]. Однако среди изучаемых нозологий не было групп пациентов с отравлениями (сложность взаимодействия с токсикологическими центрами), поэтому было принято решение разработать экспериментальную модель системного воспаления при отравлении ацетаминофеном на экспериментальных животных. Интоксикация ацетаминофеном у мышей может рассматриваться в качестве потенциально перспективной модели системного воспаления (наличие повреждений в сердечно-сосудистой [8], центральной нервной [10, 11, 12], мочеполовой системах [1]).

Цель исследования – экспериментально обосновать LD-50 (lethal dose, 50%) для дальнейшего изучения наличия системного воспаления при отравлении ацетаминофеном у мышей линии C57Bl/6, оценить показания общего и биохимического анализов крови после введения ацетаминофена.

Материалы и методы

В исследовании использовались мыши-самцы линии C57Bl/6 в возрасте 10 недель. Эксперимент проводился в виварии ИИФ УрО РАН при строгом соблюдении требований по уходу и содержанию животных, а также выводу их из эксперимента с последующей утилизацией в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123 от 18.03.1986, Страсбург), Рекомендациями Европейской Комиссии 2007/526/ЕС от 18 июня 2007 года, Директивой 2010/63/EU европейского парламента и совета европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях. Организация исследования одобрена этическим комитетом ФГБУН ИИФ УрО РАН, протокол № 04/22 от 18 ноября 2022 г.

Для определения полулетальной дозы экспериментальным животным внутрибрюшин-

но вводили «Ифимол» (Unique Pharmaceutical Laboratories, Индия) или раствор ацетаминофена (Sigma-Aldrich, США) с концентрацией 14 мг/мл после 12-часового голодания. При этом для «Ифимола» вводимые дозы составили – 500 мг/кг, 600 мг/кг, 750 мг/кг, 1000 мг/кг массы тела, а для раствора ацетаминофена в концентрации 14 мг/мл – 500, 600, 750 мг/кг массы тела.

В дальнейшей экспериментальной группе животных вводили раствор ацетаминофена (Sigma-Aldrich, США) с концентрацией 14 мг/мл в полулетальной дозе после 12-часового голодания. Контрольной группе вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме. На вторые сутки у выживших мышей проводили забор образцов печени и периферической крови из бедренной артерии.

В дальнейшем был проведен гематологический и биохимический анализы крови, гистологический анализ с оценкой общей патоморфологической картины срезов. Анализ периферической крови проведен на автоматизированном гематологическом анализаторе Mindray BC-2800Vet (Mindray, Китай). Статистическая обработка полученных данных проводилась при помощи программного обеспечения Statistica 10 (StatSoft Inc., США).

Результаты и обсуждение

В ответ на введение «Ифимола» в дозе 750 мг/кг к 14 суткам у мышей отмечалась 50% летальность; в дозе 500 мг/кг – 12,5% летальность; дозировки 400 мг/кг, 650 мг/кг, 1000 мг/кг не вызывали гибели животных. Гибель животных при этом происходила на 6 или 7 сутки после введения препарата.

При внутрибрюшинном введении раствора, полученного путем разведения ацетаминофена в физиологическом растворе в концентрации 14 мг/мл, доза 500 мг/кг не вызывала гибели животных. Доза в 750 мг/кг вызывала 66%-ную летальность. 50%-ная летальность отмечалась при введении дозы 600 мг/кг массы тела. Гибель животных в этих условиях была зафиксирована в первые 12, 24, 48 часов после введения препарата.

По данным исследований, представленных в литературе, полулетальная доза ацетаминофена для мышей составляет 338 мг/кг [7], 500 мг/кг [3] при внутрибрюшинном способе введения препарата. В нашем исследовании при введении «Ифимола» (раствора ацетаминофена для инфузий, применимого в клинической практике в Российской Федерации) внутрибрюшинно экспериментальным животным в дозах 400 мг/кг и 500 мг/кг массы тела выхода на LD-50 достичь не удалось. При этом, несмотря на то, что доза в 750 мг/кг

ТАБЛИЦА 1. ОПИСАТЕЛЬНАЯ СТАТИСТИКА ИССЛЕДУЕМЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В ГРУППАХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. DESCRIPTIVE STATISTICS OF THE INDICATORS STUDIED IN THE GROUPS OF EXPERIMENTAL ANIMALS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Parameters	Группы (№) Groups (No.)	Контрольная (№ 1) Control (No. 1) n = 7	Экспериментальная (№ 2) Experimental (No. 2) n = 7
ALT, мкмоль/мин × л ALT, μmol/min × L		17,00 (11,00-20,00) ²	81,90 (63,50-89,40) ¹
AST, мкмоль/мин × л AST, μmol/min × L		12,60 (10,30-16,40) ²	131,50 (130,50-137,70) ¹
AST/ALT, у. е. AST/ALT, c. u.		1,19 (1,07-1,23) ²	0,59 (0,49-0,66) ¹
Амилаза, мг/с × л Amylase, mg/s × L		27,00 (25,40-32,50)	28,40 (20,50-37,40)
Креатинин, мкмоль/л Creatinine, μmol/L		55,60 (54,40-78,20) ²	88,50 (79,10-102,80) ¹
Лейкоциты, 10⁹/л Leukocytes, 10 ⁹ /L		2,40 (2,00-4,90) ²	2,10 (1,50-3,20) ¹
Лимфоциты, 10⁹/л Lymphocytes, 10 ⁹ /L		1,90 (1,50-3,10) ²	0,65 (0,50-1,30) ¹
Моноциты, 10⁹/л Monocytes, 10 ⁹ /L		0,00 (0,00-0,10)	0,00 (0,00-0,10) ¹
Гранулоциты, 10⁹/л Granulocytes, 10 ⁹ /L		0,70 (0,40-1,10) ²	1,60 (1,20-1,90) ¹
Лимфоциты, % Lymphocytes, %		74,00 (65,50-77,60) ²	32,15 (27,90-36,80) ¹
Моноциты, % Monocytes, %		2,50 (1,30-3,30)	1,90 (1,80-2,70)
Гранулоциты, % Granulocytes, %		24,70 (19,90-31,00) ²	65,15 (61,40-70,30) ¹
Эритроциты, 10¹²/л Red blood cells, 10 ¹² /L		9,43 (8,74-10,53)	9,45 (7,01-13,14)
Тромбоциты, 10⁹/л Platelets, 10 ⁹ /L		1374,00 (1152,00-1427,00) ²	374,00 (96,00-420,00) ¹

Примечание. ¹ – статистически значимые отличия (U-критерий Манна–Уитни, p < 0,05) от группы № 1, ² – статистически значимые отличия (U-критерий Манна–Уитни, p < 0,05) от группы № 2.

Note. ¹, statistically significant differences (Mann–Whitney (U) test, p < 0.05) with group No. 1, ², statistically significant differences (Mann–Whitney (U) test, p < 0.05) with group No. 2.

вызывала 50%-ную летальность, дозировка в 1000 мг/кг не вызвала гибели животных в течение 14 суток. Поэтому было принято решение перейти на использование ацетаминофена фирмы «Sigma-Aldrich», при введении которого полулетальная доза составила 600 мг/кг массы тела.

На основании полученных данных была разработана экспериментальная модель для изучения наличия системного воспаления у мышей линии C57Bl/6 при передозировке ацетаминофеном. Экспериментальным группам мышей линии C57Bl/6 вводился раствор ацетаминофена (14 мг/мл) в дозе 600 мг/кг массы тела. Контроль-

ным группам животных вводился физиологический раствор в эквивалентном объеме.

При проведении гистологического исследования срезов печени животных, выведенных из эксперимента через 48 часов, с окраской гематоксилин/эозин были выявлены очаговые некрозы в центрлобулярных областях, повышение ядерного полиморфизма гепатоцитов, дезорганизация структуры печени, что соотносится с литературными данными [4, 5, 8, 9, 13].

По данным биохимического анализа крови статистически достоверно различались активность аспартатаминотрансферазы, аланинами-

нотрансферазы, значение коэффициента де Ритиса (AST/ALT) по сравнению с контрольной (см. табл. 1). При этом отмечалось снижение значения данного коэффициента. Изменение данных показателей указывает на наличие повреждения клеток печени и нарушение ее нормального функционирования.

Также статистически значимо различалась концентрация креатинина у экспериментальной группы по сравнению с контрольной, что может говорить о развитии к 48 часам после введения препарата повреждения почек.

Среди показателей гематологического анализа крови статистически значимые различия были по количеству лейкоцитов, тромбоцитов, а также абсолютному и относительному содержанию гранулоцитов и лимфоцитов.

Изменения данных показателей указывают на активацию иммунной системы и реакцию системы микротромбообразования.

Таким образом, через 48 часов после введения экспериментальным животным полулетальной

дозы ацетаминофена отмечались признаки повреждения внутренних органов (печень, почки), изменения показателей иммунной системы, что аналогично компонентам системного воспаления у людей. Поэтому исследование показателей крови и изменений внутренних органах экспериментальных животных требует дальнейшего изучения.

Выводы

1. LD-50 для внутрибрюшинного введения ацетаминофена у самцов мышей линии C57Bl/6 составляет 600 мг/кг, что существенно выше дозировок, указанных в литературных источниках.

2. Через 48 часов после введения LD-50 экспериментальным животным статистически значимо различались активность аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, значения коэффициента де Ритиса, креатинина, лейкоцитов, тромбоцитов, а также абсолютное и относительное содержание гранулоцитов и лимфоцитов.

Список литературы / References

1. Горшков А.Н., Марусов И.В., Ягмуров О.Д., Игнатов Ю.Д., Кузнецова Н.А., Петрова Ю.А. Морфологические аспекты нефротоксического действия нестероидных противовоспалительных средств // *Нефрология*, 2013. Т. 17, № 1. С. 73-77. [Gorshkov A.N., Marusov I.V., Yagmurov O.D., Ignatov Yu.D., Kuznetsova N.A., Petrova Yu.A. Morphologic aspects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs nephrotoxic effect. *Nefrologiya = Nephrology*, 2013, Vol. 17, no. 1, pp. 73-77. (In Russ)].
2. Craig D.G.N., Reid T.W.D.J., Martin K.G., Davidson J.S., Hayes P.C., Simpson K.J. The systemic inflammatory response syndrome and sequential organ failure assessment scores are effective triage markers following paracetamol (acetaminophen) overdose. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2011, Vol. 34, no. 2, pp. 219-228.
3. Dahlin D.C., Nelson S.D. Synthesis, decomposition kinetics, and preliminary toxicological studies of pure N-acetyl-p-benzoquinone imine, a proposed toxic metabolite of acetaminophen. *J. Med. Chem.*, 1982, Vol. 25, no. 8, pp. 885-886.
4. Gosselin M., Daze Y., Mireault P., Crahes M. Toxic myocarditis caused by acetaminophen in a multidrug overdose. *Am.J. Forensic Med. Pathol.*, 2017, Vol. 38, no. 4, pp. 349-352.
5. Guo H., Sun J., Li D., Hu Y., Yu X., Hua H., Jing X., Chen F., Jia Z., Xu J. Shikonin attenuates acetaminophen-induced acute liver injury via inhibition of oxidative stress and inflammation. *Biomed. Pharmacother.*, 2019, Vol. 112, 108704. doi: 10.1016/j.biopha.2019.108704.
6. Krenkel O., Mossanen J.C., Tacke F. Immune mechanisms in acetaminophen-induced acute liver failure. *Hepatobiliary Surg. Nutr.*, 2014, Vol. 3, no. 6, pp. 331-343.
7. Lewis R.J. SAX's dangerous properties of industrial materials. *J. Hazard. Mater.*, 2005, Vol. 119, no. 1-3, pp. 258-258.
8. Lim A.Y., Segarra I., Chakravarthi S., Akram S., Judson J.P. Histopathology and biochemistry analysis of the interaction between sunitinib and paracetamol in mice. *BMC Pharmacol.*, 2010, Vol. 10, pp. 1-17.
9. Neff S.B., Neff T.A., Kunkel S.L., Hogaboam C.M. Alterations in cytokine/chemokine expression during organ-to-organ communication established via acetaminophen-induced toxicity. *Exp. Mol. Pathol.*, 2003, Vol. 75, no. 3, pp. 187-193.
10. Philippot G., Hallgren S., Gordh T., Fredriksson A., Fredriksson R., Viberg H. A cannabinoid receptor type 1 (CB1R) agonist enhances the developmental neurotoxicity of acetaminophen (Paracetamol). *Toxicol. Sci.*, 2018, Vol. 166, no. 1, pp. 203-212.
11. Philippot G., Gordh T., Fredriksson A., Viberg H. Adult neurobehavioral alterations in male and female mice following developmental exposure to paracetamol (acetaminophen): characterization of a critical period. *J. Appl. Toxicol.*, 2017, Vol. 37, no. 10, pp. 1174-1181.

12. Viberg H., Eriksson P., Gordh T., Fredriksson A. Paracetamol (acetaminophen) administration during neonatal brain development affects cognitive function and alters its analgesic and anxiolytic response in adult male mice. *Toxicol. Sci.*, 2014, Vol. 138, no. 1, pp. 139-147.
13. Xiao Q., Zhao Y., Ma L., Piao R. Orientin reverses acetaminophen-induced acute liver failure by inhibiting oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *J. Pharmacol. Sci.*, 2022, Vol. 149, no. 1, pp. 11-19.
14. Zotova N., Zhuravleva Y., Chereshev V., Gusev E. Acute and chronic systemic inflammation: features and differences in the pathogenesis, and integral criteria for verification and differentiation. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 2, 1144. doi: 10.3390/ijms24021144.

Авторы:

Зудова А.И. — младший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Мухлынина Е.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Соломатина Л.В. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Zudova A.I., Junior Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Mukhlynina E.A., PhD, MD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Solomatina L.V., PhD, MD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Поступила 31.03.2024
Отправлена на доработку 31.03.2024
Принята к печати 16.04.2024

Received 31.03.2024
Revision received 31.03.2024
Accepted 16.04.2024