

**ВЛИЯНИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ИЛИ
L-КАРНИТИНА НА АЗОТИСТЫЙ ОБМЕН У КРЫС ПРИ ОСТРОЙ
ИНТОКСИКАЦИИ ЦИКЛОФОСФАНОМ**

В.Л. Рейнюк, Ю.Ю. Ивницкий, Т.В. Шефер*

Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, г. Санкт-Петербург, ул. Академика

Лебедева, дом 6., тел. 8(812)292-32-48; E-mail: vladton@mail.ru

**ФГУН Институт токсикологии ФМБА России, г. Санкт-Петербург, ул. Бехтерева 1*

Резюме:

При моделировании на крысах миелоабляционных режимов применения циклофосфана (Ц) наблюдали угнетение, нарушение функций равновесия и координации движений, повышение уровня аммиака, (наиболее выраженное в крови из каудального отдела *v. cava caud.*), мочевины и глутамина крови. На фоне введения дексаметазона, преднизолона, вольтарена или L-карнитина, уремия, повышение уровня аммиака в портальной крови, а также вызывавшиеся Ц неврологические нарушения были менее выраженными, продолжительность жизни увеличивалась. Обсуждена роль повреждения уротелия мочевого пузыря и рециклирования мочевины в патогенезе неврологических расстройств, вызывавшихся Ц.

Ключевые слова: *L-карнитин; циклофосфан; аммиак; мочевина; глутамин*

**THE INFLUENCE OF ANTI-INFLAMMATORY DRUGS OR L-CARNITINE ON
NITROGEN METABOLISM IN ACUTE CYCLOPHOSPHAMIDE POISONING IN
RATS**

V. L. Rejniuk, Ju. Ju. Ivitsky, T. V. Schøfer*

Military Medical Academy S.M. Kirov named, 194044, St. Petersburg

**Federal State Science Institution "The Institute of toxicology" FMBA Russian Federation*

Summary:

In cyclophosphamide (CY) myeloablative regimens rat model, the syndrome manifested by depression, ataxia and equilibrium disorders, increased blood ammonia, glutamine and urea levels, was observed. Neurological disorders, portal blood ammonia and blood urea content alterations were mitigated, the mean survival time were increased by the preventive administration of dexamethasone, prednisolone, voltaren or L-carnitine. The role of damaged urinary bladder urothelium and the increased urea recycling in the pathways of CY-induced neurological syndrome has been discussed.

Keywords: *L-carnitine, cyclophosphamide, ammonia, urea, glutamine*

Введение. Циклофосфан (Ц) - оксазафосфоринное производное бис (β-хлорэтил)-амина - применяется для лечения лимфом, лейкозов и некоторых солидных опухолей. Как правило, его суточная доза не превышает 50 мг/кг, отражая компромисс между эффективностью и переносимостью. Минимальная миелоабляционная доза Ц - 120 мг/кг [7] - также не исключает рецидивы основного заболевания, при этом вызывая геморрагический цистит, повреждение печени и лёгких [6]. Преодоление летальной панцитопении с помощью пересадки стволовых кроветворных клеток создаёт условия для применения Ц в дозах, на порядок превышающих используемые при консервативных терапевтических режимах [8]. Однако такая дозировка может вести к острым неврологическим расстройствам, у крыс проявляющихся угнетением, тремором, утратой рефлексов и судорогами [16]. У людей сходный синдром (тремор, судороги, дезориентация, утрата сознания), наблюдался при болюсном в/в назначении метил-бис- (β-хлорэтил) амина в дозе 2,5 мг/кг [4].

Ввиду способности Ц нарушать функции печени [10] и почек [15], в формирование описанного симптомокомплекса могут вовлекаться не только метаболиты Ц, но и эндогенные токсичные вещества. Их поступлению в кровь из желудочно-кишечного тракта может способствовать некроз клеток в криптах кишечного эпителия, наблюдаемый уже через 1 ч после введения Ц в нейротоксических дозах [14], а поступлению в кровь из мочи - геморрагический цистит [6].

Ранее, при моделировании на крысах миелоабляционных режимов применения Ц, мы наблюдали гиперозотемию [16]. Один из подходов к выяснению роли этого явления в патогенезе острой нейротоксичности Ц предполагает сопоставление влияния лекарственных средств на тяжесть интоксикации и на азотистый обмен. В настоящей работе «фармакологическими зондами» служили противовоспалительные средства (ПВС), широко используемые для профилактики побочных эффектов противоопухолевой терапии [5], и L-карнитин, при острой интоксикации Ц проявляющий нефропротекторные свойства [15].

Материалы и методы.

Белых крыс-самцов массой 140-180 г, приобретённых в питомнике «Рапполово» АМН РФ, распределяли в пять групп (интактную и получавшие профилактические средства). В течение суток перед экспериментом животных не кормили; доступ к воде не ограничивали. В качестве ПВС использовали дексаметазон (КРКА, Словения, 1 мг/кг), преднизолон (Никомед, Австрия, 5 мг/кг) и вольтарен (Новартис, Швейцария, 30 мг/кг). Карнитин применяли в дозе 2579 мг/кг в виде сиропа «Элькар» (ЗАО «Корпорация

Олифен»). Все препараты вводили в/ж в водных растворах в объёме 20 мл/кг, за 1 ч до в/б введения Ц («Деко», Россия). Контрольные животные получали воду.

В 1-й серии опытов в крови из *v. portae* и *v. cava caud.* определяли концентрацию аммиака, глутамина и мочевины через 3 ч после в/б введения Ц (600 мг/кг). *V. portae* пунктировали краниальнее *v. pylorica*; *v. cava caud.* - в двух точках: каудальнее впадения *vv. renales* и краниальнее впадения *vv. hepaticae*. Кровь (1 мл) депротеинировали трихлоруксусной кислотой; в супернатанте определяли аммиак с реактивом Несслера [2], глутамин — по аммиаку после кислотного гидролиза [17] и мочевины - с диацетилмоноксимом с помощью набора реактивов «Ольвекс Диагностикум». За 2 мин до лапаротомии крыс наркотизировали тиопенталом натрия (в/б 75 мг/кг).

Во 2-й серии опытов оценивали влияние лекарственных средств на тяжесть интоксикации. Сомноленцию констатировали при отсутствии побежки в ответ на перкуссию хвоста, сопор - при утрате постурального и аудиомоторного рефлексов, кому - при утрате всех рефлексов, кроме роговичного. Для интегральной оценки вестибулярной функции и координации движений ежечасно в течение 6 ч после введения Ц измеряли продолжительность удерживания крыс на высоте 40 см на стеклянной сфере диаметром 9 см. Рассчитывали среднегрупповые значения этого показателя и среднюю продолжительность жизни (СПЖ).

Значимость межгрупповых различий метаболических показателей оценивали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа и критерия наименьшей значимой разности Фишера; продолжительности жизни или удерживания на сфере - с помощью рангового однофакторного анализа Краскела-Уоллиса и критерия Коновера [3].

Результаты и обсуждение.

Введение Ц вело к повышению уровня аммиака в крови из *v. portae*, краниального или каудального сегментов *v. cava caud.* в 2,8; 3,2 и 4,7 раза, соответственно (табл.). Во всех пробах возрастало содержание мочевины (в 2,3-2,5 раза) и глутамина (в 1,7-1,9 раза). Порто-кавальный градиент содержания аммиака по абсолютной величине возрастал (164 ± 22 против 72 ± 11 мкМ, $p \leq 0,05$), хотя его отношение к уровню аммиака в портальной крови имело тенденцию к снижению (61 против 85%).

На фоне применения профилактических средств уровень аммиака в портальной крови был в 1,4-1,8 раз ниже, чем в их отсутствие; в крови из *v. cava caud.* снижение было незначительным. ПВС снижали уровень мочевины крови в 1,3-1,5 раза и глутамина - в 1,2-1,3 раза; L-карнитин предупреждал уремический эффект Ц почти полностью (табл.).

Таблица

Влияние ПВС или L-карнитина на показатели обмена аммиака в крови из вен брюшной полости крыс при острой интоксикации циклофосфаном

Место вене- пунк- ции	Лекарственные средства		Показатели обмена аммиака ($M \pm m, n = 6$)		
	в/ж	в/б	Аммиак, мкМ	Глутамин, мкМ	Мочевина, мМ
<i>v. portae</i>	—	—	157 ± 11	1355 ± 181	4,4 ± 0,3
	—	Ц	432 ± 33*	2622 ± 768	10,9 ± 0,4*
	Дексаметазон	Ц	298 ± 9*†	2000 ± 380	8,3 ± 0,7*†
	Преднизолон	Ц	262 ± 18*†	2025 ± 83*	8,5 ± 1,3*
	Вольтарен	Ц	260 ± 22*†	1755 ± 170	7,5 ± 0,4*†
	L-карнитин	Ц	239 ± 8*†	2649 ± 255	6,5 ± 0,8†
<i>v. cava caudalis</i> (краниальный сегмент)	—	—	85 ± 5	1239 ± 66	5,1 ± 0,3
	—	Ц	268 ± 51*#	2363 ± 89*	11,8 ± 0,5*
	Дексаметазон	Ц	251 ± 14*#	1877 ± 245*	8,9 ± 0,6*†
	Преднизолон	Ц	240 ± 13*	1917 ± 91*†	9,2 ± 0,9*†
	Вольтарен	Ц	198 ± 10*#	1953 ± 151*	8,1 ± 0,4*†
	L-карнитин	Ц	204 ± 7*#	2020 ± 145	7,4 ± 1,0†
<i>v. cava caudalis</i> (каудальный сегмент)	—	—	63 ± 11#	1261 ± 95	4,7 ± 0,3
	—	Ц	293 ± 44*#	2161 ± 75*	11,6 ± 0,4*
	Дексаметазон	Ц	220 ± 9*#	1815 ± 293	8,6 ± 0,7*†
	Преднизолон	Ц	237 ± 15*	1761 ± 134†	8,8 ± 0,9*†
	Вольтарен	Ц	213 ± 5*	1718 ± 147†	7,7 ± 0,4*†
	L-карнитин	Ц	202 ± 6*#	1951 ± 146	6,8 ± 0,7†

Значимое различие, $p \leq 0,05$:

— * с интактными животными;

— † с животными, получавшими только циклофосфан;

— # с соответствующим показателем для *v. portae*.

В течение 3 ч после введения Ц в дозе 600 мг/кг у крыс развивалась сомноленция, 1000 мг/кг - сопор и тремор с эпизодами судорог, 1400 мг/кг - кома. При вскрытии погибших животных (при дозах Ц 600-1400 мг/кг) выявляли геморрагический цистит. На фоне применения ПВС или L-карнитина сопор отмечали через 4-6 ч после введения Ц, а в их отсутствие - через 3-4 ч. Применение профилактических средств увеличивало продолжительность удерживания животных на сфере в 2-3 раза (при всех дозах Ц, кроме 1400 мг/кг); возрастала СПЖ у крыс, получивших Ц в дозах 200 или 600 мг/кг (рис.).

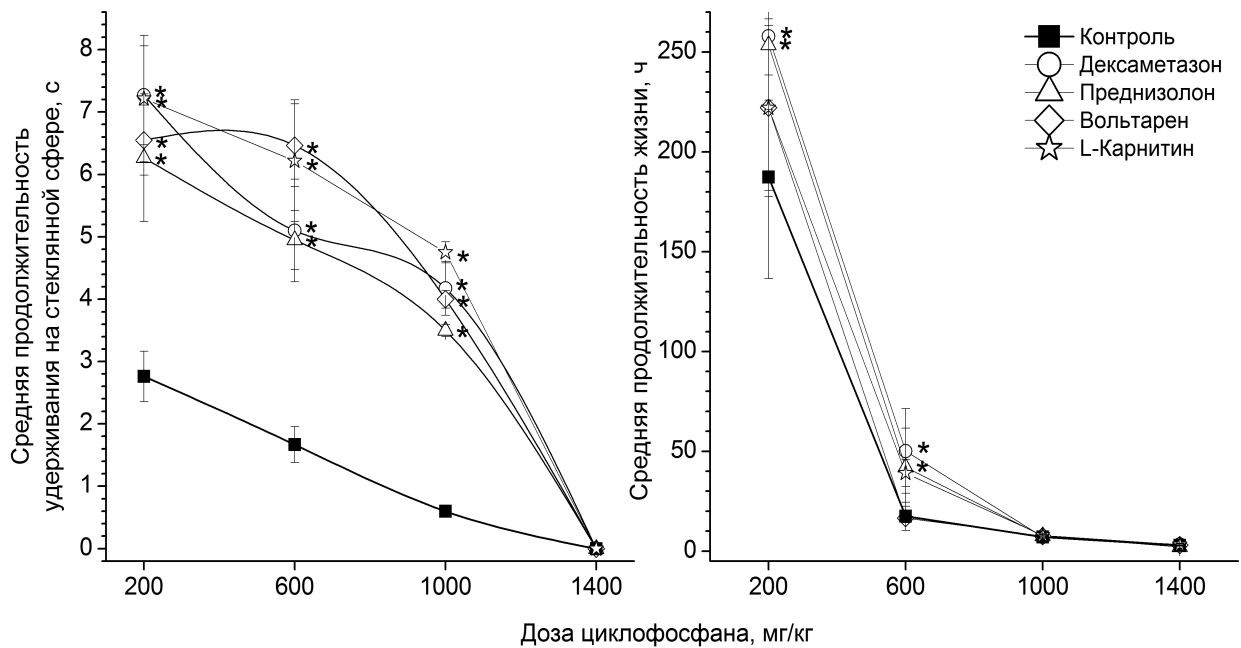


Рисунок. Влияние противовоспалительных лекарственных средств или L-карнитина на тяжесть интоксикации циклофосфаном у крыс ($M \pm m$, $n = 6$)

* - значимые различия с крысами, не получавшими профилактических средств, $p \leq 0,05$

Таким образом, введение крысам Ц в дозе, вызывавшей острые неврологические расстройства, увеличивало содержание в крови аммиака и продуктов его детоксикации - глутамина и мочевины. Относительное увеличение содержания аммиака было наибольшим в крови из каудального сегмента *v. cava caud.* Эту кровь отбирали каудальнее впадения почечных и печёночной вен, поэтому преимущественное накопление в ней аммиака было обусловлено не нарушениями его обмена в почках или печени, а переносом из органа, кровь из которого поступает в *v. cava caud.* каудальнее указанной точки.

Кишечник и мочевого пузыря, в просвете которых концентрация аммиака на 2-3 порядка выше, чем в крови, служат его основными депо в организме. Апикальные мембраны уротелия мочевого пузыря, в норме непроницаемые для аммиака и мочевины мочи, теряют это свойство при моделировании цистита [12]. Поэтому наблюдавшийся у животных гемморрагический цистит создавал предпосылки для поступления аммиака в каудальный сегмент *v. cava caud.* как через мочепузырные вены, так и по механизму трансперитонеальной диффузии, описанному нами ранее [16]. Очевидно, роль цистита в формировании гипераммониемии была основной, хотя способствовать развитию гипераммониемии могло и увеличение проницаемости для аммиака слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта, возможность чего вытекает из ранее полученных данных о потенцировании острой токсичности Ц ацетатом аммония, вводимым в желудок [9].

В развитие гипераммониемии могла быть вовлечена и уремия, вероятными причинами которой служили нарушение фильтрационной функции почек, характерное для токсического действия метаболитов Ц [15], и геморрагический цистит. В желудочно-кишечном тракте крыс до $\frac{2}{3}$ всего аммиака образуется при разложении бактериальной уреазой мочевины, диффундирующей в люминальное пространство; скорость уреолита лимитирована доступностью мочевины [11]. Поэтому уменьшение портальной гипераммониемии на фоне применения ПВС или L-карнитина могло быть обусловлено торможением рециклирования мочевины вследствие снижения её уровня в крови.

Рециклирование мочевины сопровождается значительным потреблением АТФ и негативно отражается на энергетической обеспеченности не только печени, но и всего организма [1; 13]. Не исключена причинная связь интенсификации этого процесса с такими проявлениями токсического действия Ц, как вестибулярные нарушения, атаксия, сомноленция, сопор и кома. Поэтому снижение уровня мочевины крови могло быть вовлечено в механизм профилактического действия исследованных лекарственных средств. Полученные данные поддерживают гипотезу о причастности гиперазотемии к формированию неврологических проявлений острой интоксикации Ц.

Выводы.

1. При моделировании на крысах миелоабляционных режимов применения циклофосфана наблюдается угнетение, нарушение функций равновесия и координации движений, повышение уровня аммиака, (наиболее выраженное в крови из каудального отдела *v. cava caud.*), мочевины и глутамина крови.

2. На фоне введения дексаметазона, преднизолона, вольтарена или L-карнитина, уремия, повышение уровня аммиака в портальной крови, а также вызывавшиеся циклофосфаном неврологические нарушения были менее выраженными, продолжительность жизни увеличивалась.

Литература.

1. Браунштейн А.Е. Процессы и ферменты клеточного метаболизма. – М.: Наука, 1987. – 548 с.
2. Barrett J.F. A modified Nessler's reagent for the micro-determination of urea in tungstic acid blood filtrate. // Biochem. J., 1935. – Vol. 29. – P. 2442–2445.
3. Bortz J., Lienert G.A., Boehnke K. Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik // Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2008. – 942 s.

4. Clifford P., Bhardwaj B.V., Whittaker L.R. Intensive nitrogen mustard therapy with abdominal aortic occlusion in nasopharyngeal carcinoma. // *Brit. J. Cancer.*, 1965. - Vol. 19. - P. 51–71.
5. Feyer P. Konsensuspapier zur antiemetischen Therapie. // *Focus Onkologie.*, 2000. - Bd 5. - S. 44-47.
6. Fraiser L.H., Kanekai S., Kehrer J.P. Cyclophosphamide toxicity. Characterizing and avoiding the problem. // *Drugs.*, 1991. - Vol. 42. - P. 781–795.
7. Gupta V., Lazarus H.M., Keating A. Myeloablative conditioning regimens for AML allografts: 30 years later. // *Bone Marrow Transplantation.*, 2003. - Vol. 32. – P. 969–978.
8. Haioun C, Lepage E, Gisselbrecht C, et al. Survival benefit of high-dose therapy in poor-risk aggressive non-Hodgkin's lymphoma: final analysis d'Etude des lymphomes de l'Adulte study. // *J Clin Oncol.*, 2000. – Vol. 18. – P. 3025–3030.
9. Ivnitsky J.J., Schafer T.V., Rejniuk V.L. Promotion of the toxic action of cyclophosphamide by digestive tract luminal ammonia in rats. // *ISRN Toxicology.*, 2011. - Vol. 2011. Article ID 450875, 4 pages, 2011. doi:10.5402/2011/450875. – Режим доступа: <http://www.hindawi.com/isrn/toxicology/2011/450875/>, свободный.
10. De Jonge M.E., Huitema A.D.R., Beijnen J.H., Rodenhuis S. High exposures to bioactivated cyclophosphamide are related to the occurrence of veno-occlusive disease of the liver following high-dose chemotherapy. // *Brit. J. Cancer.*, 2006. – Vol. 94. – P. 1226–1230.
11. Kim K., Lee W., Benevenga N.J. [Feeding diets](#) containing high levels of milk products or cellulose decrease urease activity and ammonia production in rat intestine. // *J. Nutr.*, 1998. - Vol. 128. - P. 1186–1191.
12. Lavelle J., Apodaca G., Meyers S. et al. Disruption of guinea pig urinary bladder permeability barrier in noninfectious cystitis. // *Am. J. Physiol.*, 1998. - Vol. 274, N 1. - P. 205-214.
13. Mobley H., Hausinger R. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. // *Microbiol. Rev.*, 1989. - Vol. 53, N 1. - P. 85-108.
14. Moore J.V. The 'gastrointestinal syndrome' after chemotherapy: inferences from mouse survival time, and from histologically- and clonogenically- defined cell death in intestinal crypts. // *Brit J. Cancer.*, 1986. - Vol. 53. - P. 16-19.
15. Sayed-Ahmed M. Progression of cyclophosphamide-induced acute renal metabolic damage in carnitine-depleted rat model. // *Clin. Exp. Nephrology.*, 2010. - Vol. 14, N 5. - P.418-426.

16. Schäfer T.V., Ivniisky J.J., Rejniuk V.L. Cyclophosphamide-induced leakage of gastrointestinal ammonia into the common bloodstream in rats. // Drug Chem. Toxicol., 2011. – Vol. 34(1). - P. 25-31.
17. Whitehead T.P., Whittaker S.R.F. A method for the determination of glutamine in cerebrospinal fluid and the results in hepatic coma. // J. Clin. Path., 1955. – Vol. 8. - P. 81–84.