

РОЛЬ ЛЮМИНАЛЬНОГО ПУЛА АММИАКА ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА В РЕАЛИЗАЦИИ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЦИКЛОФОСФАНА НА КРЫС

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

*ФГУН Институт токсикологии ФМБА России, 192019, Санкт-Петербург,

ул. Бехтерева, д. 1, (812) 365-06-80, neugierig@mail.ru

***Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, 194044, Санкт-Петербург,

ул. Академика Лебедева, д. 6, (812) 542-10-83, mal-vn@yandex.ru

Резюме. Для оценки влияния изменений пула аммиака в пищеварительном тракте на острую токсичность циклофосфана определены (1) динамика содержания аммиака, глутамина и мочевины в крови крыс после внутрибрюшинного введения циклофосфана (600 мг/кг) на фоне внутрижелудочного введения ацетата аммония в нелетальной дозе 12 ммоль/кг (0,4 ЛД₅₀) и (2) клинические проявления интоксикации и продолжительность жизни крыс после введения циклофосфана в дозах 200, 600, 1000 или 1400 мг/кг *per se* либо в сочетании с ацетатом аммония. Введение ацетата аммония усиливало гипераммониемический и уремический эффект циклофосфана. Сочетанное действие токсикантов сопровождалось симптомами, характерными для острого отравления солями аммония; при изолированном действии ацетата аммония эти симптомы не наблюдались. Ацетатом аммония усиливался летальный эффект циклофосфана, вводившегося в дозах 200, 600, 1000 или 1400 мг/кг: средняя продолжительность жизни крыс снижалась в 1,5, 2,1, 2,8 или 6,1 раз, соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что перераспределение аммиака из пищеварительного тракта в общий кровоток является одним из механизмов танатогенеза при острой интоксикации циклофосфаном.

Ключевые слова: крысы; циклофосфан; ацетат аммония; аммиак крови; мочевина крови; средняя продолжительность жизни

THE ROLE OF THE DIGESTIVE TRACT LUMINAL AMMONIA POOL IN CYCLOPHOSPHAMIDE TOXICITY IN RAT

Schäfer T.V.*, Rejniuk V.L.*, Malakhovsky V.N.***, Ivnitsky J.J.*

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

***Medical Military Academy

Abstract. To estimate the influence of the digestive tract luminal ammonia pool on acute toxic effects of cyclophosphamide, the dynamics of blood ammonia, glutamine and urea

level, symptoms of toxic action and the survival time have been studied in rats, intraperitoneally treated with cyclophosphamide, at the background of the gavage with non-lethal dose of ammonium acetate (12 mmol/kg, i. e. 0.35 LD₅₀). Ammonium acetate enhanced the hyperammonaemic action of cyclophosphamide while promoting its lethal action: the mean survival time decreased 1.5, 2.1, 2.8, or 6.1 times at the background of cyclophosphamide i/p doses 200, 600, 1000, or 1400 mg/kg, respectively. Animals exposed to the combination of toxicants, manifested symptoms which were characteristic of the effect of lethal doses of ammonia salts. These data provide the evidence of the detrimental role of gastrointestinal luminal ammonia in the acute high-dose cyclophosphamide toxicity.

Keywords: rats; cyclophosphamide; ammonium acetate; blood ammonia; blood urea; mean survival time

Введение

Нейротоксические эффекты — одно из характерных осложнений миелоабляционной цитостатической терапии β-галогенированными алкиламинами, известными под названием азотистых ипритов [1—4]. Другими побочными эффектами являются гепатотоксичность [5, 6] и энтеротоксичность [3, 7]. Нарушение барьерной функции печени и кишечного эпителия может вести к увеличению потока аммиака из просвета желудочно-кишечного тракта в кровь и формированию гипераммониемии [8]. Гипераммониемия закономерно возникает при шоке [9, 10], который является одним из эффектов острого воздействия азотистых ипритов в высоких дозах [11]. В свою очередь, нейротоксическое действие аммиака способно усугубить побочные эффекты цитостатиков и снизить порог их непереносимости. Из этого следует гипотеза о возможной зависимости токсичности азотистых ипритов от величины пула аммиака, содержащегося в просвете желудочно-кишечного тракта. Одним из подходов к её проверке служит оценка изменения токсичности циклофосфана на фоне увеличения пула аммиака в просвете пищеварительного тракта путём внутрижелудочного (в/ж) введения животным ацетата аммония (АА).

Цель исследования: оценить роль люминального пула аммиака желудочно-кишечного тракта в реализации токсического действия циклофосфана на крыс.

Материалы и методы

Животные. Исследования проводили на самцах беспородных крыс-альбиносов массой 200—240 г, приобретённых в питомнике Рапполово АМН РФ. В течение суток перед использованием в эксперименте животных не кормили при неограниченном доступе к воде. Крыс распределяли по экспериментальным группам методом жеребьёвки.

Введение ацетата аммония и циклофосфана. Ацетат аммония (х. ч., ЗАО «Вектон», Россия) вводили однократно в/ж в виде водного раствора в дозе 12 ммоль/кг (0,35 ЛД₅₀). Официальный препарат циклофосфана (АО «Биохимик») растворяли в дистиллированной воде *ex tempore* и вводили однократно тотчас после АА внутрибрюшинно (в/б) в дозах 200, 600, 1000 или 1400 мг/кг, соответствовавших величинам средней продолжительности жизни (СПЖ), предварительно установленным для крыс этой же серии, 240, 51, 13 и 2 ч. Каждый токсикант вводили в объёме 10 мл/кг. Контрольные животные вместо циклофосфана получали воду, а вместо АА — эквивалентное количество ацетата натрия (АН).

Биохимические исследования. Для определения азотистых метаболитов кровь немедленно депротеинировали 10%-ной трихлоруксусной кислотой. Аммиак определяли с реактивом Нesslera [12]. Содержание глутамин рассчитывали по возрастанию концентрации аммиака в пробах после 10-минутного гидролиза при 100°C в присутствии 0,3 М H₂SO₄ [13]. Мочевину определяли с диацетилмонооксимом, используя наборы реактивов ООО «Ольвекс Диагностикум» (Россия).

План исследования. Проведено две серии экспериментов, каждая из которых выполнялась за один день. Число животных в каждой из экспериментальных групп составляло шесть, исключая определение СПЖ, где число крыс составляло 11 на каждую дозу циклофосфана.

В 1-й серии экспериментов оценивали влияние циклофосфана на обмен аммиака на фоне увеличенного пула аммиака в просвете желудочно-кишечного тракта. Аммиак, глутамин и мочевину определяли в крови, полученной из туловища крыс через 0,5; 1,5 или 3 ч после введения АА и (или) циклофосфана (600 мг/кг).

Во 2-й серии экспериментов выявляли клиническое значение обнаруженных изменений обмена аммиака. Для этого оценивали влияние АА на симптоматику интоксикации, вызванной введением циклофосфана в дозах 200, 600, 1000 или 1400 мг/кг, и на продолжительность жизни животных.

Статистическая обработка результатов исследования. Значимость межгрупповых различий средних величин содержания метаболитов в крови оценивали с

помощью гетероскедастического t - критерия Стьюдента, межгрупповых различий СПЖ — с помощью U -критерия Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение

Изолированное введение интактным крысам АА не сопровождалось какими-либо клиническими проявлениями токсичности. Введение циклофосфана в дозе 200 мг/кг заметно не влияло на поведение животных в течение 18 ч; при дозе 600 мг/кг в эти сроки прогрессировали сомноления и сопор. Циклофосфан в дозах 1000 или 1400 мг/кг вызывал тремор, потерю постурального и аудиомоторного рефлексов в течение 3 ч; в сроки 1—6 ч сопор эпизодически прерывался тоническими судорогами. Видимых признаков интоксикации не было в ближайшие 0,5 ч после введения Ц в любой из испытанных доз, кроме 1400 мг/кг.

Через 0,5—3 ч после введения циклофосфана и (или) АА уровень аммиака, глутамина и мочевины в крови был повышен. На фоне совместного применения токсикантов уровень аммиака в крови возрастал в 2,3 раза, в сравнении с контролем, в то время как на фоне изолированного применения циклофосфана такой уровень достигался на 1,5—2 ч позже. Через 0,5—1,5 ч после совместного применения АА и циклофосфана уровень аммиака в крови был в 1,6—2,3 раза выше, чем при изолированном применении циклофосфана. Повышение уровня глутамина и мочевины на фоне совместного применения АА и циклофосфана также было более существенным, чем при их изолированном применении (рисунок 1).

Премедикация нелетальной дозой АА усугубляла летальное действие циклофосфана: у крыс, получивших циклофосфан в дозах 200, 600, 1000 или 1400 мг/кг, на фоне введения АА СПЖ была в 1,5, 2,1, 2,8 или 6,1 раза меньше, чем при введении циклофосфана в сочетании с АН (рисунок 2). У животных, получавших циклофосфан в сочетании с АА, проявлялись симптомы, характерные для отравления солями аммония — экзофтальм, транзиторное возбуждение, крупный тремор, сменяющийся опистотонусом и апноэ.

В человеческом организме пищеварительный тракт является основным источником аммиака, поступающего в кровь, несмотря на значительную индивидуальную вариабельность интенсивности аммонийногенеза, зависящую от состава кишечной микрофлоры и характера питания [14, 15]. В норме аммиак легко абсорбируется слизистой оболочкой желудка [16], тонкой [17] и толстой [18] кишок. В среднем за сутки около 4 г

аммиака поступают из кишечника в портальную систему [19]. Уровень аммиака в крови печёочной вены линейно зависит от его уровня в портальной крови [20], а последний — от люминальной концентрации аммиака [16]. Уровень аммиака в крови нижней полой вены может иметь аналогичную связь с его люминальной концентрацией в связи со значительной интенсивностью трансперитонеальной диффузии аммиака [21]. Таким образом, поток аммиака желудочно-кишечного происхождения в общий кровоток и далее в мозг может зависеть от люминального пула аммиака в пищеварительном тракте. Особую значимость эта зависимость может приобретать на фоне нарушения барьерной функции кишечной слизистой оболочки, которое является характерным для резорбтивного действия ипритов [3, 7, 22].

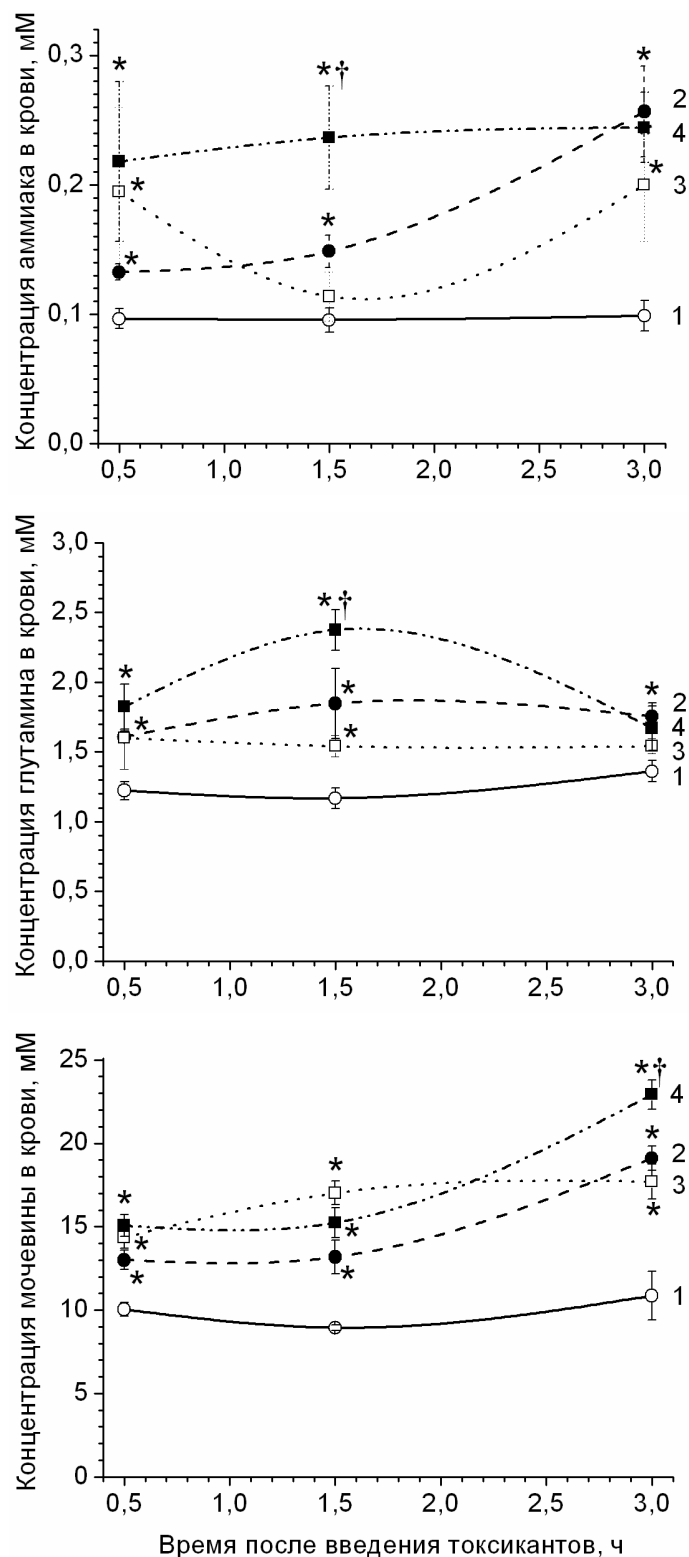


Рисунок 1. Содержание аммиака, глутамина и мочевины в крови крыс ($M \pm m$, $n = 6$) после внутрибрюшинного введения циклофосфана в дозе 600 мг/кг и (или) внутривенного введения ацетата аммония в дозе 12 ммоль/кг. 1 — контроль; 2 — циклофосфан; 3 — ацетат аммония; 4 — ацетат аммония и циклофосфан. * — Значимое

различие с контрольной группой, $p \leq 0,05$; † — значимое различие с группой «ацетат аммония», $p \leq 0,05$.

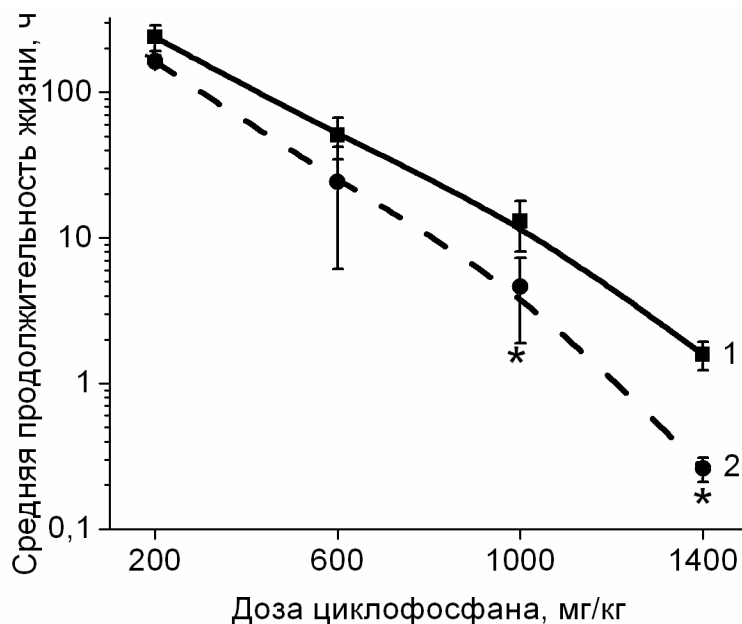


Рисунок 2. Влияние внутрижелудочного введения ацетата аммония в дозе 12 ммоль/кг на среднюю продолжительность жизни крыс ($M \pm m$, $n = 11$) после последующего внутрибрюшинного введения циклофосфана в дозах 200—1400 мг/кг. 1 — контроль; 2 — ацетат аммония. * — Значимое различие с контрольной группой, $p \leq 0,05$

В настоящей работе наблюдался отчётливо выраженный гипераммониемический эффект в сроки 0,5—3 ч после введения циклофосфана. На фоне в/ж введения АА этот эффект был больше, чем при изолированном применении циклофосфана (рисунок 1). У интактных крыс люминальный пул аммиака в пищеварительном тракте составляет около 1,1 ммоль на кг массы тела (рассчитано по данным [23]). Как видно, применявшаяся в настоящей работе доза АА была достаточной для увеличения этого пула на порядок. В связи с этим зависимость гипераммониемического эффекта циклофосфана от величины люминального пула аммиака в пищеварительном тракте имела положительный характер.

Азотистые иприты способны подавлять синтез мочевины в печени крыс *in vitro* в концентрациях, сопоставимых с ожидаемыми после введения животным в летальных дозах [24]. Гипотетически, аналогичный эффект мог быть причастным к наблюдавшейся в настоящей работе гипераммониемии. Однако одновременно с аммиаком увеличивалось содержание в крови глутамина и мочевины (рисунок 1). Поэтому полученные данные не поддерживают такую гипотезу. Как было показано ранее [8], ведущим механизмом

гипераммониемии, вызываемой у крыс циклофосфаном в летальных дозах, является интенсификация диффузии аммиака из пищеварительного тракта в бассейн задней полой и воротной вены. Следовательно, увеличение гипераммониемического действия циклофосфана на фоне введения АА можно связать с дальнейшим возрастанием интенсивности этой диффузии, обусловленным повышением градиента концентрации аммиака в системе «просвет желудочно-кишечного тракта — кровь».

Усугубление гипераммониемического действия циклофосфана на фоне увеличения люминального пула аммиака пищеварительного тракта сопровождалось потенцированием летального эффекта: степень потенцирования положительно коррелировала с дозой циклофосфана (рисунок 2). Вовлечение аммиака в формирование летального исхода убедительно доказывалось акцентуацией симптоматики, характерной для острого отравления солями аммония; максимальное уменьшение СПЖ наблюдалось на фоне наиболее тяжёлых неврологических расстройств. Соответственно, наибольший неблагоприятный эффект от перераспределения аммиака желудочно-кишечного происхождения можно ожидать при введении азотистых ипритов в летальных дозах, характерных для их применения в миелоабляционных режимах.

Аммиак обладает значительной цитотоксичностью: в неионизированной форме свободно диффундируя в клетки и вступая в реакции аминирования, он нарушает катаболическую функцию цикла Кребса [25]. Обусловленное этим ограничение окислительного ресинтеза АТФ может усугубляться истощением клеточного пула НАД⁺ в результате гиперактивации поли-АДФ-рибозилирования вследствие вызванного алкилирующим агентом повреждения ДНК [26]. В связи с этим, перераспределительная гипераммониемия может быть вовлечена в формирование не только неврологических расстройств, но и других резорбтивных эффектов циклофосфана. На это указывает снижение СПЖ, наблюдавшееся на фоне применения АА, у животных, получавших циклофосфан в дозе 200 мг/кг, не вызывавшей клинически значимых неврологических расстройств. Таким образом, у крыс величина люминального пула аммиака пищеварительного тракта является фактором, существенно влияющим на проявления острой тяжёлой интоксикации циклофосфаном.

Выводы

1. Увеличение люминального пула аммиака пищеварительного тракта крыс путём в/ж введения ацетата аммония в субтоксической дозе 12 ммоль/кг усугубляет как гипераммониемический, так и летальный эффект циклофосфана, а также вызывает появление у отравленных циклофосфаном животных симптомов, характерных для острого отравления солями аммония.

2. Полученные данные свидетельствуют о неблагоприятной роли аммиака желудочно-кишечного происхождения в патогенезе острой тяжёлой интоксикации циклофосфаном.

Литература

1. Wolfgang, G. H. J. Antineoplastic agents / G. H. J. Wolfgang, M. E. I. Leibbrandt // In: Comprehensive toxicology, Vol. 7. — Cambridge: Cambridge University Press, 1997. — P. 525—547.
2. Zinzani, PL. (2006). Salvage chemotherapy in follicular non-Hodgkin's lymphoma: focus on tolerability / P. L. Zinzani // Clin. Lymphoma Myeloma. — 2006. — Vol 7. — P. 115—124.
3. Lorch, A. Single versus sequential high-dose chemotherapy in patients with relapsed or refractory germ cell tumors: a prospective randomized multicenter trial of the German Testicular Cancer Study Group / A. Lorch, C. Kollmannsberger, J. T. Hartmann [et al.] // J. Clin. Oncol. — 2007. — Vol. 25. — P. 2778—2784.
4. Kuçi, S. Adult cells as an alternative source of multipotential (pluripotential) cells in regenerative medicine / S. Kuçi, Z. Kuçi, H. Latifi-Pupovci [et al.] // Curr. Stem Cell Res. Ther. — 2009. — Vol. 4. — P. 107—117.
5. McDonald, G. B. Cyclophosphamide metabolism, liver toxicity, and mortality following hematopoietic stem cell transplantation / G. B. McDonald, J. T. Slattery, M. E. Bouvier [et al.] // Blood. — 2003. — Vol. 101. — P. 2043—2048.
6. Саратиков, А. С. Коррекция токсичности циклофосфана гепатопротекторами полифенольной природы / А. С. Саратиков, А. В. Ратькин, В. Н. Фролов, В. С. Чучалин // Бюллетень сибирской медицины. — 2004. — № 1. — С. 52—56.
7. Haubitz, M. Acute and long-term toxicity of cyclophosphamide / M. Haubitz // Transplantationsmedizin. — 2007. — Vol. 19. — P. 26—31.
8. Schäfer, T. V. Cyclophosphamide-induced leakage of gastrointestinal ammonia into the common bloodstream in rats / T. V. Schäfer, J. J. Ivnitsky, V. L. Rejniuk // Drug. Chem. Toxicol., 2011. — Vol. 34, N 1. — P. 25—31.
9. Hankins, J. The origin and utilization of ammonia in shock: a comparison of the levels of blood ammonia in the portal and systemic circulation during shock induced by the fine technique / J. Hankins, S. Bessman, A. Mansberger, R. A. Cowley // Bull. Soc. Int. Chir. — 1959. — Vol. 18. — P. 20—30.
10. Imler, M. Hepatic origin of hyperammonemia induced by shock in normal rats / M. Imler, D. Schlienger // Arch. Int. Physiol. Biochem. — 1977. — Vol. 85. — P. 101—115.
11. Brown, E. E. Internal fluid shifts secondary to intraperitoneal nitrogen mustard / E. E. Brown, H. K. Wright // Surg. Forum. — 1964. — Vol. 15. — P. 386—387.

12. Barrett, J. F. A modified Nessler's reagent for the micro-determination of urea in tungstic acid blood filtrate / J. F. Barrett // *Biochem. J.* — 1935. — Vol. 29. — P. 2442—2445.
13. Whitehead, T. P. A method for the determination of glutamine in cerebrospinal fluid and the results in hepatic coma / T. P. Whitehead, S. R. F. Whittaker // *J. Clin. Path.* — 1955. — Vol. 8. — P. 81—84.
14. Soeters, P. B. Ammonia and glutamine metabolism of the intestine. The effect of lactulose and neomycin / P. B. Soeters, P. A. van Leeuwen // *Infusionster Klin. Ernahr.* — 1986. — Bd. 13. — S. 186—190.
15. Bongaerts, G. Effect of antibiotics, prebiotics and probiotics in treatment for hepatic encephalopathy / G. Bongaerts, R. Severijnen, H. Timmerman // *Med. Hypotheses.* — 2005. — Vol. 64. — P. 64—68.
16. Gips, C. H. The arterial ammonia curve after oral and intraduodenal loading with ammonium acetate. Absorption in the stomach / C. H. Gips, G. S. Qué, M. Wibbens-Alberts // *Neth. J. Med.* — 1973. — Vol. 16. — P. 14—17.
17. Mossberg, S. M. Ammonia movement in the small intestine: preferential transport by the ileum / S. M. Mossberg, G. Ross // *J. Clin. Invest.* — 1967. — Vol. 46. — P. 490—498.
18. Singh, S. K. An apical permeability barrier to $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ in isolated, perfused colonic crypts / S. K. Singh, H. J. Binder, J. P. Geibel, W. F. Boron // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1995. — Vol. 92. — P. 11573—11577.
19. Summerskill, W. H. Ammonia metabolism in the gut / W. H. Summerskill, E. Wolpert // *Am. J. Clin. Nutr.* — 1970. — Vol. 23. — P. 633—639.
20. Dobson, G. P. In vivo portal-hepatic venous gradients of glycogenic precursors and incorporation of $[3\text{-}^3\text{H}]\text{glucose}$ into liver glycogen in the awake rat / G. P. Dobson, R. L. Veech, J. V. Passoneau, M. T. Huang // *J. Biol. Chem.* — 1990. — Vol. 265. — P. 16350—16357.
21. Рейнюк, В. Л. Потенцирование аммиаком летального действия этанола на крыс / В. Л. Рейнюк, Т. В. Шефер, Ю. Ю. Ивницкий // *Бюлл. эксп. биол. мед.* — 2008. — Т. 145. — С. 688—691.
22. Kehe, K. Medical aspects of sulfur mustard poisoning / K. Kehe, L. Szinicz // *Toxicology.* — 2005. — Vol. 214. — P. 198—209.
23. Kim, K. Feeding diets containing high levels of milk products or cellulose decrease urease activity and ammonia production in rat intestine / K. Kim, W. Lee, N. Benevenga // *J. Nutr.* — 1998. — Vol. 128. — P. 1186—1191.

24. Barron, E. S. G. The effect of nitrogen mustard on enzymes and tissue metabolism. II. The effect on tissue metabolism / E. S. G. Barron, G. R. Bartlett, Z. B. Miller [et al.] // J. Exp. Med. — 1948. — Vol. 87. — P. 503—519.

25. Haghighat, N. Effect of ammonia chloride on energy metabolism of astrocytes and C6 glioma cells in vitro / N. Haghighat, D. W. McCandless // Metab. Brain Dis. — 1997. — Vol. 12. — P. 287—298.

26. Korkmaz, A. Molecular targets against mustard toxicity: implication of cell surface receptors, peroxynitrite production, and PARP activation / A. Korkmaz, H. Jaren, T. Topal, S. Oter // Arch. Toxicol. — 2006. — Vol. 80. — P. 662—670.