

## РАННИЕ ИЗМЕНЕНИЯ БАРЬЕРНОЙ ФУНКЦИИ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ У КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ МИЕЛОАБЛЯЦИОННОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ЦИКЛОФОСФАНОМ

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

*\*Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, 194044, Санкт-Петербург,  
ул. Академика Лебедева, д. 6, (812) 542-10-83, [mal-vn@yandex.ru](mailto:mal-vn@yandex.ru)*

*\*\*ФБГУН «Институт токсикологии» ФМБА России, 192019, Санкт-Петербург, ул.  
Бехтерева, д. 1, (812) 365-06-80, [neugierig@mail.ru](mailto:neugierig@mail.ru)*

**Резюме.** Целью исследования была проверка гипотезы о компрометации урогематического барьера при миелоабляционной химиотерапии циклофосфаном (ЦФ). Введение в мочевой пузырь интактных крыс растворов ацетата аммония или мочевины, по концентрации на порядок превышавших максимальное содержание аммиака или мочевины в нормальной моче, либо 1% раствора красителя Эванса голубого (ЭГ), выявляло наличие проницаемости уротелия для аммиака и ЭГ, но не для мочевины. На фоне введения ЦФ интенсифицировалось поступление ЭГ в кровь и, в меньшей степени, его накопление в головном мозгу и внутренних органах; выявлялось повышение проницаемости уротелия для мочевины, но не аммиака; введение мочевины потенцировало гипераммониемию, вызываемую ЦФ. Клиническое значение полученных данных определяется вовлечением аммиака, образующегося в результате уроэнтерогематической циркуляции мочевины, в формирование нейротоксичности ЦФ.

**Ключевые слова:** циклофосфан; крысы; мочевой пузырь; аммиак; мочевина; краситель Эванса голубой

## EARLY CHANGES IN URINARY BLADDER BARRIER FUNCTION IN CYCLOPHOSPHAMIDE MYELOABLATIVE CHEMOTHERAPY RAT MODEL

Schäfer T.V. \*, Rejniuk V.L. \*, Ivnitsky J.J. \*\*

**Abstract.** The subject of the study was the hypothesis of the compromised urinary bladder barrier function in cyclophosphamide (CY) myeloablative chemotherapy. In intact rats, the intravesical instillation of ammonium acetate or urea solutions (10-fold concentrated compared with higher ammonia or urea urine levels) or 1% Evans blue dye (EB) revealed the permeability of urothelium to ammonia or EB, but not to urea. CY promoted the flux of EB into the blood and, to a lesser extent, the accumulation of EB in brain and visceral organs, increased the permeability of urothelium to urea, but not to ammonia. Intravesical administration of urea promoted the CY-induced hyperammonaemia. Involvement of ammonia produced by the increased urea recycling, determines the clinical relevance of these data.

**Keywords:** cyclophosphamide; rats; urinary bladder; ammonia; urea; Evans blue dye

### Введение

Циклофосфан (ЦФ) — оксазафосфоринное производное бис-(β-хлорэтил)-амин — применяется для лечения лимфом, лимфолейкозов и некоторых солидных опухолей. Наиболее опасные проявления его токсического действия при курсовом назначении в суточных дозах до 50 мг/кг, характерных для «консервативных» режимов лечения, включают в себя иммуносупрессию и геморрагический цистит [1]. При миелоабляционных режимах применения, например, при подготовке пациентов к пересадке аллогенных стволовых кроветворных клеток, разовые дозы ЦФ достигают 120 мг/кг [2, 3]. В этих случаях на первый план выходят нейро- и нефротоксичность [4], токсический миокардит [1] и веноокклюзионное поражение печени [5]. При однократном введении в миелоабляционной дозе наименьший латентный период (4—8 ч) характерен для клинических проявлений нейротоксического действия ЦФ, таких как эметический синдром, головная боль, заторможенность и судороги [6, 7]. В экспериментах на крысах этот синдром, включающий в себя угнетение, тремор, нарушение рефлексов и, в отдельных случаях, судороги, сопровождается выраженной гипераммониемией [8]. Гипераммониемия потенцирует нейротоксическое действие ЦФ [9], что оправдывает интерес к механизмам её возникновения. С учётом способности ряда метаболитов ЦФ

накапливаться в моче [10] и специфически повреждать мочевой пузырь [11], можно ожидать изменений проницаемости его стенки для веществ, содержащихся в моче, в том числе для аммиака и мочевины. Однако неизвестно, происходят ли такие изменения в ближайшие часы после введения ЦФ в миелоабляционной дозе.

**Цель исследования:** определить направленность и специфичность изменений проницаемости стенки мочевого пузыря для аммиака и мочевины в условиях моделирования на крысах миелоабляционной химиотерапии с использованием ЦФ.

### Материалы и методы

*План исследования.* В качестве средств исследования барьерной функции уротелия мочевого пузыря использовали диагностические препараты: краситель Эванса голубой (ЭГ), ацетат аммония и мочевины, растворы которых инстиллировали в мочевой пузырь с последующим определением этих веществ в крови и (или) тканях. Проведено три серии экспериментов.

В первой серии изучали влияние ЦФ на поступление ЭГ из просвета мочевого пузыря в кровь и накопление его в лёгких, печени, подвздошной кишке, головном мозгу и лёгких. Формировали две экспериментальные группы: контрольную (животные, которым раствор ЭГ вливали в мочевой пузырь через 3 ч после в/б инъекции физиологического раствора) и опытную (инстиляция ЭГ через 3 ч после в/б введения ЦФ). В каждой из указанных групп выделяли по три подгруппы животных — обследуемых через 5, 15 либо 30 мин после инстиляции ЭГ в мочевой пузырь.

Во второй серии экспериментов изучали влияние ЦФ на содержание аммиака и мочевины в крови, отобранной из задней полой вены, после внутривезикулярного введения раствора ацетата аммония. Формировали четыре экспериментальные группы животных:

- в/б введение физиологического раствора и, через 3 ч после этого, вливание в мочевой пузырь раствора ацетата натрия;
- в/б введение физиологического раствора и, через 3 ч после этого, вливание в мочевой пузырь раствора ацетата аммония;
- в/б введение раствора ЦФ и, через 3 ч после этого, вливание в мочевой пузырь раствора ацетата натрия;
- в/б введение раствора ЦФ и, через 3 ч после этого, вливание в мочевой пузырь раствора ацетата аммония.

В каждой из указанных групп выделяли по три подгруппы животных — обследуемых через 5, 15 либо 30 мин после инстиляции ацетата аммония.

В экспериментах третьей серии влияние ЦФ на уровень аммиака и мочевины в

крови из задней поллой вены после внутрипузырной инстиляции мочевины изучали по схеме экспериментов второй серии, однако вместо растворов ацетата аммония или ацетата натрия использовали раствор мочевины либо хлорида натрия, соответственно.

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

*Лекарственные средства и диагностические препараты, порядок их применения.*

Применение ЦФ в миелоабляционной дозе, составляющей для людей 120 мг/кг [2], с учётом видовых различий массы и площади поверхности тела [12], моделировали его однократным введением крысам в дозе 600 мг/кг (3,3 ЛД<sub>50</sub>). Официальный препарат ЦФ (АО «Биохимик») растворяли в дистиллированной воде *ex tempore* и вводили в/б в объёме 10 мл/кг; контрольные животные получали физиологический раствор.

ЭГ (Sigma-Aldrich, Индия) вводили интравезикально в дозе 50 мг/кг в виде 1% водного раствора в объёме 5 мл/кг, через 3 ч после введения ЦФ. Для этого крыс усыпляли хлороформом, тотчас фиксировали спиной книзу и катетеризировали мочевой пузырь полиэтиленовой частью канюли для в/в инфузий. Выпустив мочу и введя в мочевой пузырь раствор ЭГ, пережимали клитор кишечным жомом.

Ацетат аммония либо ацетат натрия (х. ч., ЗАО «Вектон», Россия) вводили в просвет мочевого пузыря в дозе 12 ммоль/кг в виде 2,4 М водных растворов, в объёме 5 мл/кг, через 3 ч после введения ЦФ, тем же способом, что и ЭГ.

Мочевину (чда, ЗАО «Вектон», Россия) вводили в просвет мочевого пузыря описанным выше способом через 3 ч после ЦФ в дозе 30 ммоль/кг, в виде 6 М водного раствора, приготовленного *ex tempore*, в объёме 5 мл/кг. Для сравнения, в параллельных группах вместо раствора мочевины использовали равный ему по осмолярности 3 М раствор хлорида натрия в том же объёме.

*Подготовка проб для химического исследования.* Через 5, 15 или 30 мин после инстиляции в мочевой пузырь растворов диагностических препаратов выполняли лапаротомию, пунктировали заднюю полую вену краниальнее впадения в неё правой подвздошно-поясничной вены и отбирали 1 мл крови. В первой серии опытов из крови и извлеченных исследуемых органов экстрагировали ЭГ шестикратным объёмом диметилформамида в течение суток и экстракты центрифугировали при 9000 g в течение 20 мин. Во второй и третьей сериях кровь депротеинировали равным объёмом 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и центрифугировали при 9000 g в течение 20 мин.

*Методы химического исследования.* Концентрацию ЭГ в супернатанте экстрактов

крови и органов определяли спектрофотометрически при длине волны 611 нм. Содержание аммиака в супернатанте экстрактов крови определяли с реактивом Нesslera [13], содержание мочевины в крови — по реакции с диацетилмонооксидом с помощью наборов реактивов ООО «Ольвекс Диагностикум» (Россия).

*Статистическая обработка результатов исследования.* Результаты подвергали линейному регрессионному и двухфакторному дисперсионному анализу (факторы — «токсикант» и «вещество, введённое в мочевой пузырь»); апостериорное сравнение средних величин выполняли с помощью критерия Тьюки [Ошибка: источник перекрестной ссылки не найден4].

### **Результаты**

На фоне применения ЦФ поступление в кровь ЭГ, введённого в мочевой пузырь, интенсифицировалось: с 5 по 30 мин после инстилляций средний прирост содержания красителя в крови был в пять раз больше, чем в контроле (2,64 против 0,52 нмоль/(г•мин), соответственно); прирост содержания ЭГ в головном мозгу и внутренних органах был меньшим, чем в крови (рисунок 1).

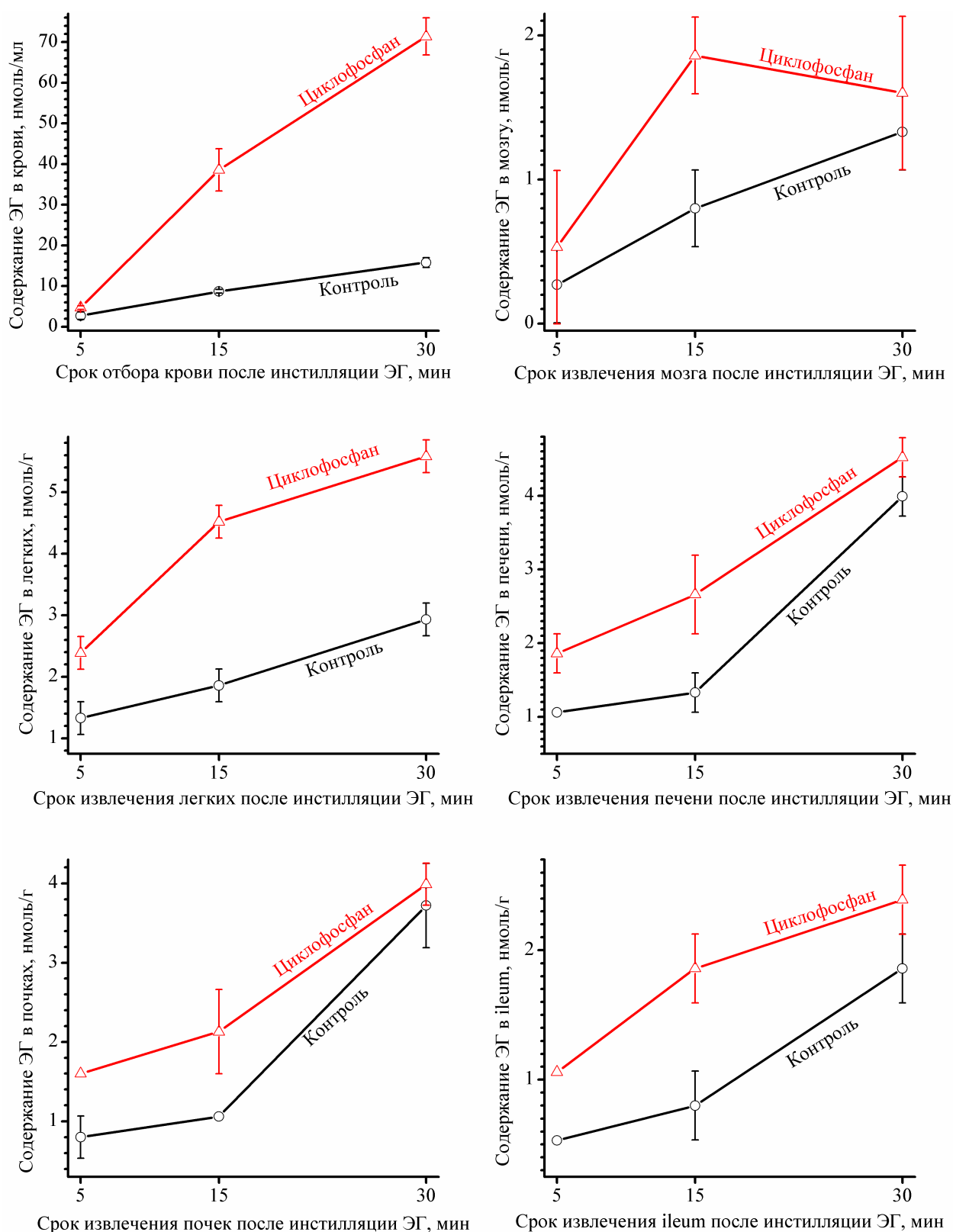


**Рисунок 1.** Накопление красителя Эванса голубого (ЭГ) в крови и органах крыс ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ) после введения циклофосфана и, через 3 ч, инстилляций в мочевиный пузырь красителя. Для крови, лёгких, печени и подвздошной кишки влияние циклофосфана значительно ( $p \leq 0,05$ )

Через 3 ч 05 мин после введения ЦФ уровень аммиака и мочевины в крови крыс

был повышен, в сравнении с контролем, в 4,0 и 1,5 раза, соответственно ( $p < 0,001$ ). На этом фоне вливание в мочевого пузырь раствора ацетата аммония вызывало у получавших ЦФ животных приблизительно такой же, как и в контроле, линейный прирост уровня аммиака в крови ( $32 \pm 4$  и  $41 \pm 5$ , соответственно) с 5 по 30 мин после инстилляций. На уровень мочевины крови инстилляцией ацетата аммония не оказывала существенного влияния. Инстилляцией раствора ацетата натрия в мочевого пузырь не влияла на изучавшиеся показатели (рисунок 2).

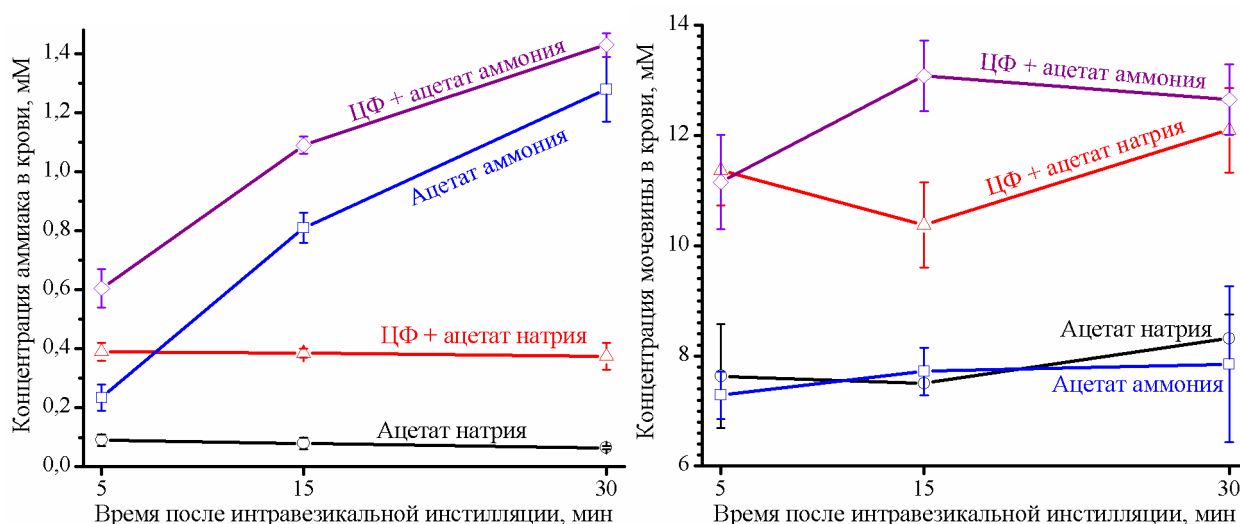


**Рисунок 2.** Динамика содержания аммиака и мочевины в крови, отобранной из задней полой вены после заполнения мочевого пузыря раствором ацетата натрия либо ацетата аммония у intactных крыс либо на фоне применения циклофосфана (ЦФ). Влияние ЦФ на содержание аммиака или мочевины, а также влияние инстилляций ацетата аммония на содержание аммиака в крови значимо ( $p \leq 0,001$ )

Вливание в мочевого пузырь раствора мочевины (но не хлорида натрия) вело к нарастанию содержания как самой мочевины, так и аммиака в крови крыс, подвергшихся воздействию ЦФ: через 30 мин уровень этих метаболитов был повышен на 26% и 16%, соответственно ( $p < 0,001$ ). У животных, не получавших ЦФ, инстилляцией мочевины в мочевого пузырь не вела к существенным изменениям изучавшихся показателей азотемии (рисунок 3).

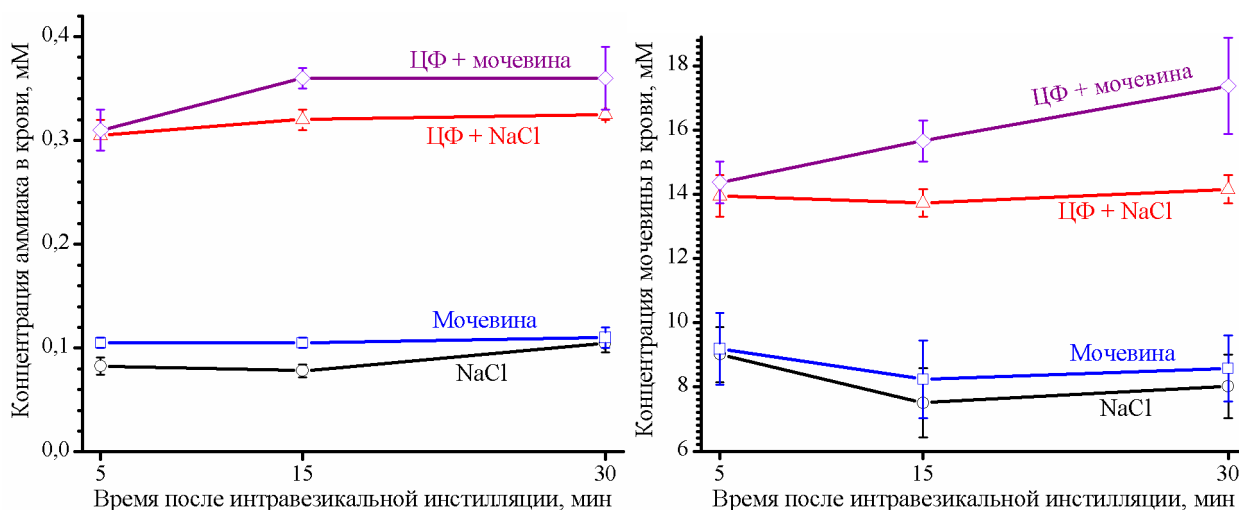


**Рисунок 3.** Динамика содержания аммиака и мочевины в крови, отобранной из задней полой вены после заполнения мочевого пузыря раствором мочевины либо хлорида натрия у интактных крыс либо на фоне применения циклофосфана (ЦФ).

Влияние ЦФ на содержание аммиака или мочевины, а также влияние инстилляций мочевины на содержание мочевины в крови животных опытной группы значимо ( $p \leq 0,05$ )

### Обсуждение

ЭГ — краситель, плохо преодолевающий гистогематические барьеры здоровых животных [15]. На фоне воздействия ЦФ поступление ЭГ из просвета мочевого пузыря в кровь интенсифицировалось, что отражает нарушение барьерных свойств мочевого пузыря. Интенсификация накопления красителя в головном мозгу и внутренних органах была выражена меньше, чем в крови (рисунок 1). Поэтому она может быть объяснена увеличением концентрации ЭГ в плазме крови, без привлечения гипотезы о нарушении проницаемости для красителя гистогематических барьеров исследованных органов крыс, получивших ЦФ.

Для проникновения через уротелий веществ средней молярной массы, к каковым относится ЭГ, характерен, преимущественно, парацеллюлярный механизм [16], предполагающий нарушение плотных межклеточных контактов уротелиоцитов, предшествующее их десквамации [17]. Поэтому полученные данные указывают на формирование такого нарушения уже к 3 ч после введения ЦФ в использовавшейся дозе. Гипотетически, утрата плотных контактов между клетками уротелия создаёт условия для интенсификации поступления из просвета мочевого пузыря в кровь не только ЭГ, но и других низкомолекулярных веществ — в том числе аммиака и мочевины.

В настоящей работе этой гипотезе соответствует повышенный уровень аммиака и мочевины в крови, полученной из задней полой вены не фоне воздействия ЦФ (рисунки 2 и 3). Аналогичные данные были получены и ранее. В частности, в крови из задней полой вены (каудальнее впадения почечных вен) уровень аммиака через 3 ч после в/б введения

ЦФ в дозе 600 мг/кг повышался более значительно, чем в крови из воротной вены [8]. Анализ анатомических отношений внутренних органов показывает, что в этой экспериментальной модели мочевого пузыря был наиболее вероятным источником утечки аммиака в кровь. Поэтому ожидалось, что на фоне воздействия ЦФ в такой же дозе интравезикальная инстилляцией соли аммония приведёт к более интенсивному поступлению аммиака из просвета мочевого пузыря в кровь, чем у интактных животных.

Перепад концентраций аммиака между мочой и кровью достигает трёх, а мочевины — двух порядков. Из этого следует, что в норме уротелий обладает значительным диффузионным сопротивлением этим метаболитам. В настоящей работе для оценки этого сопротивления мочевого пузыря заполняли растворами, по концентрации аммиака или мочевины превосходившими нормальную мочу на порядок. В крови интактных животных после инстилляцией раствора ацетата аммония содержание аммиака быстро нарастало, через 30 мин 13-кратно превышая исходный уровень (рисунок 2, слева), в то время как после инстилляцией раствора мочевины ни уровень мочевины, ни уровень аммиака в крови существенно не изменялись (рисунок 3, справа).

Таким образом, в условиях приблизительно 10-кратного превышения концентрацией мочевины физиологических значений, характерных для мочи, барьерные возможности уротелия интактных животных сохранялась, в то время как при таком же превышении физиологических значений концентрацией аммиака они оказывались исчерпанными. Объём растворов, вводившихся в мочевой пузырь, в случае соли аммония и мочевины был одинаков и не превышал 1 мл, т. е. его максимального наполнения у крыс перед уринацией в физиологических условиях (рассчитано по [18] и [19]). Используемый раствор ацетата аммония уступал раствору мочевины по осмолярности. Поэтому преодоление аммиаком урогенитического барьера интактных животных можно связать не с осмотическими эффектами ацетата аммония и не с чрезмерным растяжением уротелия, а с местным токсическим действием на него соли аммония в использовавшейся высокой концентрации.

Высокая проницаемость уротелия интактных крыс для аммиака при введении в мочевой пузырь концентрированного раствора соли аммония объясняет неожиданный, на первый взгляд, результат, заключающийся в отсутствии существенного влияния ЦФ на поток аммиака из просвета мочевого пузыря в кровь. Очевидно, такой результат был артефактом, обусловленным тем, что на фоне достигнутой максимальной скорости поступления аммиака через уротелий в кровь влияние на его кинетику ЦФ могло маскироваться. В то же время, отчётливо выявлялось вызывавшееся ЦФ нарушение барьерной функции уротелия по отношению к мочеvine (рисунок 3, справа).

Более сложным представляется объяснение гипераммониемического эффекта, развивавшегося после инстилляции мочевины в мочевой пузырь крыс, получивших ЦФ (рисунок 3, слева). Повышение концентрации мочевины в плазме крови, согласно первому закону диффузии, ускоряет её поступление по градиенту концентрации в просвет желудочно-кишечного тракта, где она служит субстратом бактериальной уреазы. В желудочно-кишечном тракте крыс до  $\frac{2}{3}$  всего аммиака образуется при разложении бактериальной уреазой мочевины, диффундирующей в люминальное пространство из крови; скорость уреолита лимитирована доступностью мочевины [20]. На фоне острой интоксикации ЦФ рост продукции аммиака из мочевины в кишечнике в сочетании с продемонстрированным ранее [9] увеличением проницаемости для аммиака энтерогематического барьера представляется одним из механизмов развития гипераммониемии. Таким образом, полученные данные отражают интенсификацию уроэнтерогематической циркуляции мочевины у крыс после введения ЦФ в дозах, характерных для миелоабляционной химиотерапии.

Резкое повышение, на фоне воздействия ЦФ в дозах, характерных для схем миелоабляционной химиотерапии, острой токсичности назначаемой энтерально соли аммония [9], свидетельствует о неблагоприятной роли описанного феномена в патогенезе острого нейротоксического действия ЦФ.

### Выводы

1. Моделирование на крысах миелоабляционной химиотерапии с использованием циклофосфана сопровождается неспецифическим повышением парацеллюлярной проницаемости уротелия мочевого пузыря для низкомолекулярных веществ с развитием на этом фоне гипераммониемии и уремии в ближайшие часы после введения данного цитостатика.

2. Интенсификация поступления мочевины из просвета мочевого пузыря в общий кровоток способствует развитию гипераммониемии у крыс после введения циклофосфана в миелоабляционной дозе.

3. Клиническое значение полученных данных определяется вовлечением аммиака, образующегося в результате уроэнтерогематической циркуляции мочевины, в формирование острой нейротоксичности циклофосфана.

### Литература

1. Fraiser L. H., Kanekai S., Kehrер J. P. Cyclophosphamide toxicity. Characterizing and avoiding the problem // Drugs. — 1991. — Vol. 42. — P. 781—795.

2. 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.
3. Raida L., Tucek P., Faber E. Et al. Comparision of new flu-bu12-tg conditioning with the standard by-cy myeloablative regimen in patients undergoing allogenic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia // Biomed. Pap. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub. — 2011. — Vol. 155. — P. 327— 332.
4. Misura K. Ifosfamide. Metabolic studies, new therapeutic approaches and new analogs // Mini Rev. Med. Chem. — 2006. N 4 — P. 395— 400.
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. Лережа В.И., Галеев И.Ш., Селезнёв А.Б. Эметический синдром. —СПб.: ООО «Издательство Фолиант», 2005 — 144 с.
7. Newton H. B. Neurological complications of chemotherapy to the central nervous system // Handb. Clin. Neurol. — 2012. — Vol. 105. — P. 903— 916.
8. Schäfer T. V., Ivnitsky J. J., Rejniuk V. L. Cyclophosphamide-induced leakage of gastrointestinal ammonia into the common bloodstream in rats // [Drug Chem. Toxicol.](#) — 2011. — Vol. 34. — P. 25—31.
9. Ivnitsky J.J. Promotion of the toxic action of cyclophosphamide by digestive tract luminal ammonia in rats / J.J.Ivnitsky, T.V.Schafer, V.L.Rejniuk // ISRN Toxicology. – 2011. -Vol. 2011, Article ID 450875, 4 pages, doi:10.5402/2011/450875. – <http://www.hindawi.com/isrn/toxicology/2011/450875/>.
10. Struck R.F., Kirk M.C., Mellet L.B., et al. Urinary metabolites of the antitumor agent cyclophosphamide // molecular Pharmacol. . — 1971. — Vol. 7. — P. 519—529.
11. Stewart F.A. Mechanism of bladder damage and repair after treatment with radiation and cytostatic drugs // Br. J. Cancer — 1986. — Vol. 53, Suppl. 7. — P. 280—291.
12. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (2-е изд., перераб., доп.) / Под ред. Р.У. Хабриева. — М.: Медицина, 2005. — 832 с.
13. 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.
14. R: A language and environment for statistical computing / R Development Core Team. — Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2012. — <http://www.R-project.org/>.
15. Hawkins B.T., Egleton R.D. Fluorescence imaging of blood-brain barrier disruption // J. Neuroscience Methods — 2012. — Vol. 151, N 2 — P. 262— 267.

16. Rubenwolf P., Southgate J. Permeability of differentiated human urothelium in vitro // *Methods Mol. Biol.* — 2011. — Vol. 763. — P. 207—222.
17. Veranic P., Jezernik K. The response of junctional complexes to induced desquamation in mouse bladder urothelium // *Biol. Cell.* — 2000. — Vol. 92, N 2. — P. 105—113.
18. Chai T.C., Gemalmaz H., Andersson K.E. et al. Persistently increased voiding frequency despite relief of bladder outlet obstruction // *J. Urol.* — 1999. — Vol. 161, N 5. — P. 1689—1698.
19. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В. Лабораторные животные – 3-е изд., перераб., доп. – Киев:Издательство «Вища школа», 1983. – 384 с.
20. 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.