

© О.В.Азарова, В.М.Брюханов, Я.Ф.Зверев, В.В.Лампатов, А.Ю.Жариков, В.П.Булгаков, С.А.Федорев, 2009
УДК 616.613-003.7:615.32]-092.4

О.В. Азарова¹, В.М. Брюханов¹, Я.Ф. Зверев¹, В.В. Лампатов¹,
А.Ю. Жариков¹, В.П. Булгаков², С.А. Федорев³

ВЛИЯНИЕ ФИТОКОМПЛЕКСОВ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ МАРЕНЫ СЕРДЦЕЛИСТНОЙ НА РАЗВИТИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО НЕФРОЛИТИАЗА У КРЫС

O.V. Azarova, V.M. Bruhanov, Ya.F. Zverev, V.V. Lampatov, A.Yu. Zharikov,
V.P. Bulgakov, S.A. Fedoreev

THE INFLUENCE OF FITOCOMPLEXES OF THE CELL CULTURE OF *RUBIA CORDIFOLIA* ON THE DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL NEPHROLITHIASIS IN RATS

¹Кафедра фармакологии Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул, Россия; ²Отдел биотехнологии Биолого-почвенного института Дальневосточного отделения Российской Академии наук, г. Владивосток, Россия; ³Лаборатория химии природных хиноидных соединений Тихоокеанского института биоорганической химии Дальневосточного отделения Российской академии наук, г. Владивосток, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬЮ ИССЛЕДОВАНИЯ явилось изучение влияния длительного введения фитокомплексов клеточной культуры марены сердцелистной на функцию почек крыс в условиях экспериментального оксалатного нефролитиаза. **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Для моделирования мочекаменной болезни самцы крыс Wistar на протяжении трех недель получали в виде питья 1% раствор этиленгликоля. Профилактическое действие фитокомплексов марены оценивали в условиях одновременного введения препарата клеточной культуры в дозе 75 мг/кг в виде суспензии на крахмальной слизи. В моче, собранной за сутки, определяли концентрацию оксалат-, фосфат-ионов и ионов кальция, а также активность ферментов лактатдегидрогеназы, гамма-глутамилтрансферазы и N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Под влиянием этиленгликоля у крыс развивался оксалатный нефролитиаз, сопровождающийся увеличением экскреции оксалата и развитием выраженной ферментурии. В условиях профилактического использования фитокомплексов клеточной культуры марены сердцелистной отмечено снижение экскреции оксалатов в 2,6 раза по сравнению с крысами с экспериментальным нефролитиазом. На фоне применения фитопрепарата зарегистрирована стабилизация активности маркерных ферментов, преимущественно лактатдегидрогеназы и гамма-глутамилтрансферазы. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Благоприятное влияние профилактического применения фитокомплексов клеточной культуры марены сердцелистной на течение экспериментальной мочекаменной болезни реализовалось в ослаблении развития оксалатурии и стабилизации активности маркерных ферментов мочи.

Ключевые слова: клеточные культуры, *Rubia cordifolia* L., нефролитиаз, оксалатурия, ферментурия.

ABSTRACT

THE AIM of the investigation was to study the influence of the long term introduction of fitocomplexes of the cell culture of *Rubia cordifolia* on the renal function of rats in the conditions of experimental oxalate nephrolithiasis. **MATERIALS AND METHODS.** For the modeling of the kidney stone disease the male rats Wistar during the three weeks received as drink water 1% solution of ethyleneglycol. The prophylactic effect of fitocomplexes of *Rubia Cordifolia* were evaluated in conditions of simultaneous injection of the cell culture in the dose of 75 mg/kg in suspension based on starch mucus. In the urine test, collected during 24 hours, the concentration of oxalate-, phosphate-ions and calcium ions, and also the activity of lactate dehydrogenase enzyme, gamma-glutamyltransferase and N-acetyl-β-D-glucosaminidase were evaluated. **RESULTS.** Under the influence of ethyleneglycol the oxalate nephrolithiasis developed in rats, with was accompanied by the increase of the oxalate excretion and the development of the fermenturia. In the conditions of prophylactic use of the fitocomplexes of the cell cultures of the *Rubia Cordifolia* was noted the decrease in oxalate excretion in 2,6 times in comparison with the rats with experimental nephrolithiasis. During the use of this fito-medicine the stabilization of the activity of marker enzymes, especially lactate dehydrogenase and gamma glutamyltransferase was registered. **CONCLUSION.** The good influence of the prophylactic use of fitocomplexes of the cell culture of *Rubia Cordifolia* on the flow of the experimental kidney stone disease was realized in lower development of oxaluria and stabilization of the activity of the urine marker ferments.

Key words: cell cultures, *Rubia cordifolia*, nephrolithiasis, oxaluria, enzimuria.

ВВЕДЕНИЕ

Мочекаменная болезнь (МБ) занимает по рас-

пространенности третье место среди урологических заболеваний, уступая по частоте только инфекциям мочевыводящих путей и патологии предстательной железы. Ежегодная заболеваемость мочекаменной болезнью, выявляемая во всех

Зверев Я.Ф. Алтайский медицинский университет, кафедра фармакологии. 656038, г. Барнаул, пр. Ленина, д.40, Телефон (3852) 26-08-35, E-mail: zver@asmu.ru

возрастных группах и наиболее часто в трудоспособном возрасте, составляет от 0,5 до 3,5% населения планеты. В России в структуре урологических заболеваний 38,2% процентов приходится на МБ [1]. Определенное место в комплексе консервативных мероприятий, направленных на коррекцию нарушений обмена камнеобразующих веществ в организме, занимает фитотерапия. Накоплен опыт использования комплексных растительных препаратов канефрон Н (Bionorica, Германия), цистон (Himalaya Drug Co., Индия), леспефлан и леспенефрил (Solvay Pharma, Россия) в профилактике и метафилактике нефролитиаза за счет комплексного действия на почки и мочевыводящие пути: диуретического, спазмолитического, противовоспалительного, антибактериального. Кроме того, некоторые из них потенцируют отхождение мелких конкрементов, их фрагментов и песка после успешного разрушения методами экстракорпоральной ударно-волновой литотрипсии. Традиционно литолитическими средствами считаются галеновые препараты на основе корней и корневищ марены красильной [2,3]. Ограниченность ассортимента фитопрепаратов, эффективных в консервативном лечении МБ, актуализирует поиск новых растительных литолитических средств. С учетом полиэтиологичности данного заболевания привлекательными фармакологическими характеристиками обладают фитокомплексы клеточной культуры марены сердцелистной *Rubia cordifolia* L., продемонстрировавшие в эксперименте выраженную диуретическую, противовоспалительную, антиоксидантную и противомикробную активность [4,5]. Вместе с тем, литолитические свойства фармакопейного сырья марены красильной *Rubia tinctorum* L. вида, морфологически и химически близкого к изучаемому сырьевому источнику, определяют целесообразность изучения фармакологической активности нового фитосырья в условиях экспериментального нефролитиаза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись фитокомплексы из каллусов марены сердцелистной. Клеточная культура *R. cordifolia* (штамм RC-I) получена в Биолого-почвенном институте Дальневосточного отделения РАН из корневищ дикорастущих растений, заготовленных в южной части Приморского края. Культивирование проводили на питательной среде $W_{B/NAA}$, содержащей 0,5 мг/л 6-бензиладенина и 2,0 мг/л α -нафтилуксусной кислоты, описанным ранее способом [6]. Фитокомплексы клеточной культуры марены представляли собой очищенные комплексы семи антрахинонов клеточной культу-

ры с их суммарным содержанием 0,76%, приготовленные по оригинальной технологии [5].

Фармакологические исследования проведены в осенний период на крысах-самцах Wistar массой 220-270 г, которых содержали на стандартной диете в естественном световом режиме. Животные находились в индивидуальных клетках, приспособленных для сбора мочи. Подопытные крысы были разделены на три группы: I – интактные животные (n=13); у крыс контрольной II группы (n=13) моделировали экспериментальный кальций-оксалатный нефролитиаз пероральным приемом в виде питья 1% раствора этиленгликоля на протяжении трех недель. Животным III группы (n=14) одновременно с началом потребления этиленгликоля вводили фитокомплексы клеточной культуры марены в ранее установленной оптимально эффективной дозе 75 мг/кг в виде суспензии на 2% крахмальной слизи. Через каждые 7 дней производили сбор суточной мочи, в которой определяли показатели экскреции ионов оксалата, фосфата и кальция. Определение фосфат-ионов проводили фотометрическим способом, основанным на фотометрической реакции образования фосфорованадомолибдатного комплекса с максимумом поглощения при длине волны 460 нм. Ионы кальция определяли методом пламенной фотометрии. Содержание оксалатов в моче устанавливали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием в качестве элюентов 80% раствора ацетонитрила при градиенте от 0 до 100% и фосфатного буфера (pH=7). Детектирование проводилось при длине волны 210 нм. Расчеты осуществляли графическим способом. Для оценки повреждения эпителия почечных канальцев проводили измерение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ, КФ 1.1.1.27), γ -глутамилтрансферазы (ГГТФ, КФ 2.3.2.2), N-ацетил- β -Д-глюкозаминидазы (НАГ, КФ 3.2.1.52). Активность ЛДГ определяли кинетическим методом, основанном на оптическом тесте О.Н. Warburg, с помощью набора фирмы Vital Diagnostics SPb (Россия). Для определения активности ГГТФ по конечной точке использовали коммерческий набор Vital Diagnostics SPb (Россия). Определение НАГ проводили спектрофотометрическим способом по модифицированной методике D. Maruhn [7]. Активность ферментов в моче представлена по отношению к содержанию креатинина, который определяли фотоколориметрическим способом по модифицированной методике S. Parper. Исследования на животных проводили в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1987 года) и Федеральным зако-

Таблица 1

Влияние фитокомплексов клеточной культуры марены (75 мг/кг) на экскрецию ионов у крыс в условиях экспериментального нефролитиаза ($X \pm m$)

Дни после начала эксперимента	Суточная экскреция											
	кальция, ммоль			фосфата, мг			оксалата, мг			креатинина, мкмоль		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
0	2,7±0,50	2,6±0,33	2,5±0,43	16,1±1,31	17,6±1,87	16,7±1,78	-	-	-	9,8±2,15	10,8±2,00	9,8±1,19
7	2,6±0,27	3,5±0,77	1,4±0,35	20,6±2,22	28,3±5,49	15,7±2,19	-	37,6±7,52*	23,8±2,91*	9,2±1,93	7,7±1,85	6,0±0,87*
14	2,3±0,34	1,4±0,30	2,8±0,43	18,5±2,01	13,4±2,7	21,1±4,36	-	25,4±6,13*	24,6±3,87*	10,6±2,11	5,0±0,56*	10,4±0,45
21	2,4±0,32	1,9±0,23	3,6±1,30	12,6±2,43	20,1±2,22	17,7±2,79	-	63,4±9,53*	24,4±2,96*	11,6±1,42	12,3±2,19	6,0±1,01*

Примечание: здесь и далее I – интактные крысы; II – крысы с экспериментальным нефролитиазом; III – крысы, профилактически получающие фитокомплексы клеточной культуры марены сердцелистной на фоне нефролитиаза. Звездочками обозначены достоверные отличия от показателей интактных животных, подчеркнуты достоверные различия между группами II и III ($p < 0,05$).

Таблица 2

Влияние фитокомплексов клеточной культуры марены (75 мг/кг) на развитие ферментурии у крыс в условиях экспериментального нефролитиаза ($X \pm m$)

Дни после начала эксперимента	Активность ферментов, U/мг креатинина											
	ЛДГ			ГГТФ			НАГ			Суточная экскреция креатинина, мкм		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
0	0,28±0,03	0,32±0,02	0,34±0,02	0,62±0,13	0,70±0,14	0,68±0,14	0,008±0,002	0,010±0,002	0,009±0,002	9,8±2,15	10,8±2,00	9,8±1,19
7	0,30±0,05	2,42±0,21*	0,66±0,13*	0,70±0,16	1,39±0,24*	0,90±0,25	0,009±0,002	0,13±0,013*	0,12±0,025*	9,2±1,93	7,7±1,85	6,0±0,87*
14	0,28±0,02	1,71±0,29*	0,64±0,17	0,60±0,15	2,60±0,28*	0,74±0,17	0,008±0,001	0,16±0,019*	0,07±0,009*	10,6±2,11	5,0±0,56*	10,4±0,45
21	0,34±0,05	1,38±0,08*	0,59±0,14	0,65±0,14	2,42±0,20*	0,72±0,12	0,006±0,001	0,13±0,018*	0,09±0,010*	11,6±1,42	12,3±2,19	6,0±1,01*

ном РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997 года. Результаты обрабатывали с помощью параметрического t-критерия Стьюдента с определением среднего арифметического значения M и его стандартной ошибки m . Анализ данных выполнен с использованием программы Biostatd для Windows.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В условиях эксперимента под влиянием литогенного агента у крыс развивался оксалатный нефролитиаз, сопровождавшийся изменением динамики экскреции исследуемых ионов с мочой (табл. 1).

Уже к концу первой недели эксперимента зафиксировано выделение оксалатов, максимум экскреции которых сформировался на 21-й день исследования. В процессе развития оксалурии под влиянием этиленгликоля накопление оксалатов в моче увеличилось более чем в 1,5 раза по сравнению с исходными показателями их экскреции. Экскреция других анализируемых ионов не изменялась столь существенно, хотя была подвержена значительным колебаниям. Так, снижение суточной экскреции всех определяемых ионов к концу второй недели эксперимента коррелировало с падением скорости клубочковой фильтрации, которую оценивали по уровню суточной экскреции креатинина. Индикацией повреждения почечного эпителия являлось развитие выраженной ферментурии (табл. 2).

На протяжении всего эксперимента фермент НАГ оказался наиболее чувствительным к дисфункции почечных канальцев на фоне гипероксалурии. Максимум активности этого фермента в моче, установившийся к концу второй недели, превышал контрольные значения в 20 раз. Менее выраженный, но последовательный рост ферментурии был отмечен в отношении ГГТФ: активность фермента в условиях экспериментального нефролитиаза была повышенной в 2,0–4,3 раза по сравнению с аналогичными показателями контрольной

группы. В динамике накопления ЛДГ было зарегистрировано постепенное снижение роста активности после манифестации ЛДГ-энзимурии к концу первой недели наблюдения, когда активность данного фермента превышала исходный уровень в 7,5 раз.

На фоне профилактического применения фитокомплекса марены отмечен регресс гипероксалурии. Уровень экскреции с мочой оксалатов стабилизировался на значениях 23,8...24,4 мг/сутки без отмеченной тенденции к росту на протяжении трех недель эксперимента. Эффективность профилактического использования фитокомплексов подтверждается снижением экскреции оксалатов на пике оксалурии в 2,6 раза по сравнению с аналогичным показателем нелеченных животных. В отношении экскреции фосфатов и кальция под действием фитокомплекса клеточной культуры не было отмечено устойчивых изменений данных показателей. Профилактический эффект фитокомплекса марены реализовался в существенном снижении показателей активности ферментов. На фоне применения препарата отмечена стабилизация активности ферментов ЛДГ и ГТТФ. На протяжении всего периода наблюдения показатели активности данных ферментов превосходили исходный уровень, однако были существенно ниже, чем у животных второй группы. В максимуме падения экскреции ферментов с мочой у животных, получавших фитопрепарат марены, показатели ферментурии в отношении ЛДГ и ГТТФ были в 3,6 раза меньше аналогичных показателей нелеченных животных (табл. 2). Наименьшую чувствительность к профилактическому применению фитокомплекса марены проявил фермент НАГ, уровень экскреции которого оставался стабильно повышенным, однако был ниже активности данного фермента у больных крыс.

ОБСУЖДЕНИЕ

Длительное применение этиленгликоля, одним из продуктов метаболизма которого является оксалат-ион, приводит к развитию вторичной гипероксалурии, что провоцирует усиленное образование в почках нерастворимых оксалатов кальция [8]. Согласно существующей минералогической классификации примерно 70-80% почечных камней являются нерастворимыми солями кальция, чаще всего представленными оксалатами. В ходе проведения исследования установлено, что в условиях длительного непрерывного употребления крысами раствора этиленгликоля происходит значительный рост экскреции оксалатов с мочой. Зафиксированная в эксперименте гипероксалурия обеспечивает создание высокой концентрации ок-

салатов в просвете почечных канальцев вплоть до перенасыщения, что обуславливает формирование центров кристаллизации с последующим образованием камней. Изменение экскреторной активности почек крыс под действием этиленгликоля сопровождалось увеличением ферментативной активности мочи. Наблюдаемый в эксперименте последовательный рост активности мембраносвязанного фермента гамма-глутамилтрансферазы, большое количество которого обнаруживается в почках, может быть обусловлен повреждением мембран клеток почечных канальцев, возникающим в условиях нефролитиаза. Семикратное увеличение высвобождения цитозольного фермента ЛДГ свидетельствует о значительном цитолизе клеток канальцев. Увеличение активности ГТТФ и ЛДГ под влиянием кристаллов оксалата в условиях оксалатного нефролитиаза было зафиксировано и другими исследователями [9-11]. Учитывая способность лизосомального фермента НАГ экскретироваться с мочой путем внутриклеточной секреции и экзоцитоза [12], отмеченный стремительный рост активности данного фермента подтверждает функциональную дисфункцию нефрона почек больных крыс.

Как положительный момент в профилактике нефролитиаза следует рассматривать стабилизацию уровня оксалурии под действием фитокомплексов клеточных культур марены сердцелистной. Уменьшение активности ГТТФ на фоне применения фитокомплексов марены до уровня, незначительно превышающего исходный, что подтверждает ранее установленный мембраностабилизирующий эффект исследуемого препарата, выявленный нами при изучении его противовоспалительной активности на моделях острого и хронического воспаления [5]. Изменение ферментативной активности мочи крыс при профилактике нефролитиаза изучаемым растительным препаратом отмечено стабилизацией активности цитозольного фермента ЛДГ, что может быть связано с постепенным ослаблением процесса цитолиза клеток канальцев. Учитывая чувствительность лизосом к различным мембранотропным веществам экзогенного происхождения, в роли которого может выступать полифенольный комплекс клеточной культуры, представляется закономерным снижение активности НАГ, связанное со стабилизацией функции лизосом в клетках канальцевого эпителия, преимущественно в его проксимальном отделе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате трехнедельного потребления крысами этиленгликоля отмечены явные признаки эк-

спериментальной мочекаменной болезни, сопровождающейся развитием гипероксалурии и ферментурии. Выявлено благоприятное влияние профилактического применения полифенольного комплекса клеточной культуры марены сердцелистной в дозе 75 мг/кг на течение экспериментальной мочекаменной болезни, что выразилось в ослаблении развития оксалурии и в стабилизации активности маркерных ферментов мочи лактатдегидрогеназы, гамма-глутамилтрансферазы и N-ацетил-β-Д-глюкозаминидазы.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Демин НВ. Мочекаменная болезнь: основные принципы лечения. *Рус Мед Журн* 2008; 16 (5): 353-358
2. Пытель ЮА, Амосов АВ. Растительный препарат канефрон в урологической практике. *Леч Врач* 1999; (6): 38-39
3. Вышковский ГЛ (ред.). *Регистр лекарственных средств России: Энциклопедия лекарств* 2008, 16 изд. РЛС, М., 2008; 1456
4. Брюханов ВМ, Азарова ОВ, Федореев СА и др. О фармакологической активности антрахинонов клеточной культуры марены сердцелистной. В: *Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: Сборник научных трудов*. Пятигорск, 2008; 386-387
5. Мищенко НП, Федореев СА, Брюханов ВМ и др. Химический состав и фармакологическая активность антрахинонов из клеточной культуры *Rubia cordifolia*. *Хим-Фарм Журн* 2007; 41 (11): 38-41
6. Mischenko NP, Fedoreyev SA, Glazunov VP et al. Anthraquinone production by callus of *Rubia cordifolia*. *Fitoterapia* 1999; (70): 552-557
7. Maruhn D. Rapid colorimetric assay of β-galactosidase and N-acetyl-β-D-glucosaminidase in human urine. *Clin Chim Acta* 1976; (73): 453-461
8. Green ML, Natch M, Freel RW. Ethylene glycol induces hyperoxaluria without metabolic acidosis in rats. *Am J Physiol Renal* 2005; (289): F536-F543
9. de Water R, Boeve ER, van Miert PP et al. Experimental nephrolithiasis in rats: the effect of ethylene glycol and vitamin D₃ on the induction of renal calcium oxalate crystals. *Scanning Microsc* 1996; 10 (2): 591-601
10. Thamilselvan S, Hackett RL, Khan SR. Cells of proximal and distal tubular origin respond differently to challenges of oxalate and calcium oxalate crystals. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10 [Suppl 14]: S452-S456
11. Veena CK, Josephine A, Preetha SP et al. Renal peroxidative changes mediated by oxalate: the protective role of fucoidan. *Life Sci* 2006; 79 (19): 1789-1795
12. Бабаева НИ, Липицкая ИЯ, Творогова МГ, Титов ВН. Диагностическое значение исследования активности N-ацетил-β-Д-глюкозаминидазы в моче (обзор литературы). *Лаб Дело* 1991; (1): 9-16

Поступила в редакцию 24.04.2009 г.

Принята в печать 06.05.2009 г.