

ВЛИЯНИЕ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК МААКИИ АМУРСКОЙ НА ТЕЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО НЕФРОЛИТИАЗА

Валерий Михайлович БРЮХАНОВ¹, Виктор Павлович БУЛГАКОВ², Александр Юрьевич ЖАРИКОВ¹,
Ольга Васильевна АЗАРОВА¹, Ольга Сергеевна ТАЛАЛАЕВА¹, Наталья Владимировна МОТИНА¹,
Екатерина Викторовна ГРИГОРУК³

¹Алтайский государственный медицинский университет
656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40

²Биолого-почвенный институт ДВО РАН
690022, г. Владивосток, пр. 100 лет Владивостоку, 159

³Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН
690022, г. Владивосток, пр. 100 лет Владивостоку, 159

Целью данной работы явилось изучение влияния клеточной культуры дальневосточного растения Маакии амурской (*Maackia amurensis* Rupr. et Maxim.) на течение экспериментального нефролитиаза. Эксперименты проведены на 60 самцах крыс Wistar. Первая (контрольная) группа животных на протяжении 6 недель получала в виде питья 1% раствор этиленгликоля. Крысам второй группы (группа лечения), начиная с 4 недели, на фоне продолжающегося потребления этиленгликоля вводили внутрь исследуемый препарат в дозе 10 мг/кг. Животные третьей группы (группа профилактики) 3 недели получали этиленгликоль с одновременным введением той же дозы препарата. Ежедневное употребление крысами контрольной группы этиленгликоля сопровождалось развитием выраженного оксалатного нефролитиаза, признаками которого являлись гипероксалурия, существенное увеличение активности маркерных ферментов (лактатдегидрогеназы, γ -глутамилтрансферазы и N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы), активация свободнорадикального окисления (СРО) в почках и крови, а также отложение в почках кальциевых депозитов. Профилактическое применение препарата культуры клеток Маакии амурской характеризовалось некоторым снижением почечной экскреции оксалат-ионов, менее выраженной активацией маркерных ферментов и угнетением процессов СРО, что указывает на уменьшение интенсивности развития нефролитиаза. В то же время морфологическое исследование не выявило каких-либо изменений по сравнению с контролем. Лечебное применение препарата Маакии обусловило существенное ослабление оксалурии. Наблюдалось выраженное снижение ферментурии, а также угнетение процесса СРО. Было зафиксировано значительное уменьшение количества кальциевых отложений и их размеров. В результате проведенных экспериментов получены свидетельства выраженной эффективности препарата клеточной культуры Маакии амурской как средства терапии экспериментального нефролитиаза.

Ключевые слова: экспериментальный нефролитиаз, Маакия амурская, лечение, профилактика.

Как известно, основной клинической формой мочекаменной болезни (МКБ) является так называемый оксалатный нефролитиаз, на долю которого приходится более 50 % всех случаев заболевания [1–3].

В одном из опубликованных ранее обзоров литературы, рассматривая патогенез МКБ, мы отметили роль почечных молекул, которые могут выступать в качестве стимуляторов литогенеза [4]. К их числу относится сиаловая кислота (СК). Установлено, что некоторые природные соединения обладают способностью ингибировать СК. Этими соединениями являются лектины — класс белков, быстро и избирательно связывающихся с сахарами. Выяснилось, что высокоспецифичные для СК лектины в значительном количестве содержатся в рас-

тении Маакия амурская (*Maackia amurensis* Rupr. et Maxim.) [5]. Кроме того, это растение содержит большое количество полифенольных соединений и фенолокислот, которые обладают способностью подавлять процессы свободнорадикального окисления (СРО) [6]. Между тем, согласно современным представлениям, СРО играет важную роль в камнеобразовании [7]. Ранее в нашей лаборатории была выявлена высокая антиоксидантная и противовоспалительная активность препарата культуры клеток Маакии амурской (ККМА). Это дало основание предположить наличие у него возможных антилитогенных свойств. Поэтому целью настоящей работы явилось изучение влияния культуры клеток Маакии амурской на течение экспериментального нефролитиаза.

Брюханов В.М. — д.м.н., проф., ректор, e-mail: rector@asmu.ru

Булгаков В.П. — д.б.н., зав. отделением биотехнологии, член-корреспондент РАН, e-mail: bulgakov@ibss.dvo.ru

Жариков А.Ю. — к.б.н., ассистент кафедры фармакологии, e-mail: zharikov_a_y@mail.ru

Азарова О.В. — к.б.н., доцент, зав. кафедрой общей химии, e-mail: kunaza@rol.ru

Талалаева О.С. — к.м.н., ассистент кафедры фармакологии, e-mail: talalaeva_olga@mail.ru

Мотина Н.В. — ассистент кафедры гистологии

Григорук Е.В. — аспирант

Материал и методы

Эксперименты проведены на 60 крысах Wistar, которые находились в индивидуальных клетках, приспособленных для сбора мочи в условиях стандартной диеты. Моделирование оксалатного нефролитиаза осуществлялось согласно общепринятой этиленгликолевой модели, суть которой заключается в том, что литогенез провоцируется постоянным употреблением подопытными животными в виде питья 1% раствора этиленгликоля (ЭГ). Одним из продуктов метаболизма ЭГ, низкомолекулярного двухатомного спирта, является оксалат-ион, поэтому хроническое применение данного вещества приводит к развитию вторичной гипероксалурии, пересыщению мочи солями CaC_2O_4 , повреждению почечного эпителия, активации процессов свободнорадикального окисления и, в конечном счете, к отложению кальциевых депозитов преимущественно в интерстициальной ткани почечного сосочка [8]. Данная модель ранее была успешно воспроизведена и в нашей лаборатории, что позволило нам взять ее на вооружение в настоящем исследовании [9].

Подопытные животные были разбиты на три группы. Первая (контрольная) группа на протяжении 6 недель получала в виде питья 1% раствор этиленгликоля. Крысам второй группы (группа лечения), начиная с 4-й недели, на фоне продолжающегося потребления ЭГ вводили внутрь препарат ККМА в дозе 10 мг/кг. Животные третьей группы (группа профилактики) 3 недели получали этиленгликоль с одновременным введением той же дозы препарата. Через каждые 7 дней производили суточный сбор мочи, в которой определяли показатели экскреции ионов оксалата и фосфата. Содержание оксалатов в моче определяли при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии. В качестве элюентов использовались 80 % раствор ацетонитрила при градиенте от 0 до 100 % и 0,1 % раствор серной кислоты. Детектирование проводилось при длине волны $\lambda = 210$ нм. Для расчетов применяли калибровочный график, который строили, используя стандартный раствор оксалат-иона в концентрации 1 мг/мл. Определение фосфатов осуществляли методом фотоэлектроколориметрии при длине волны $\lambda = 440$ нм. Методика основана на реакции образования фосфорно-молибдено-ванадиевого комплекса, который имеет характерную желтую окраску.

Одновременно в моче производили измерение активности маркерных ферментов повреждения почечного эпителия. В качестве таковых были выбраны лактатдегидрогеназа (ЛДГ, характеризует степень цитолиза клеток), γ -глутамилтрансфераза (ГГТ, свидетельствует о степени повреждения клеточных мембран), N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза (НАГ, демонстрирует функциональные нарушения нефроцитов). Активность ЛДГ определяли спектрофотометрически при длине волны $\lambda = 340$ нм. В основе метода лежит реакция восстановления пирувата до молочной кислоты. Эта реакция катализируется ЛДГ, а ее ско-

рость пропорциональна активности фермента. Каталитическую активность ГГТ, для измерения которой использовали фотоэлектроколориметрию, рассчитывали пропорционально количеству *n*-нитроанилина, образующегося в результате реакции взаимодействия L- γ -глутамил-3-карбокси-4-нитроанилида и глицил-глицина. Детектирование *n*-нитроанилина осуществляли при длине волны $\lambda = 400$ нм. Определение активности НАГ проводили по модифицированной методике Maruch [10], согласно которой она пропорциональна количеству *n*-нитрофенола, образующегося в результате реакции гидролиза *n*-нитро-N-ацетил- β -глюкозамида, катализируемой указанным ферментом. Измерение количества *n*-нитрофенола производилось спектрофотометрически при длине волны $\lambda = 400$ нм. Активность всех определяемых ферментов рассчитывали относительно концентрации креатинина в моче, выражавшейся в мг/л, и обозначали в единицах (ед./мг креатинина).

Активность процессов СРО оценивали по совокупности показателей прооксидантного и антиоксидантного статусов. Показатели прооксидантного статуса определяли в гомогенате коркового вещества почек и в плазме крови. Эвтаназию с целью забора материала проводили методом декапитации путем дислокации шейного позвонка под легким эфирным наркозом с соблюдением требований Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных или иных научных целей (Страсбург, 1986 г.), и в соответствии с Федеральным законом Российской Федерации «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997. Суммарный показатель концентрации всех прооксидантов и свободнорадикальных метаболитов, общую прооксидантную активность (ОПА) оценивали по интенсивности окраски флуоресцентного комплекса, образующегося при взаимодействии продуктов перекисного окисления ТВИН-80 с тиобарбитуровой кислотой. Дополнительно определяли концентрацию в ткани малонового диальдегида (МДА) и других тиобарбитуратреактивных продуктов (ТБРП) окисления жирных кислот.

Активность антиоксидантной системы исследовали в гомогенате коркового вещества почек и в гемолизате эритроцитов. Для оценки антиоксидантного статуса клеток определяли показатели общей антиоксидантной активности (ОАА) и активности антиоксидантных ферментов: каталазы, супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы. ОАА оценивали по степени ингибирования Fe^{2+} /аскорбат-индуцированного окисления ТВИН-80 гомогенатом ткани (гемолизатом эритроцитов). Активность каталазы определяли по подавлению ферментом окисления молибдата натрия перекисью водорода. Активность супероксиддисмутазы оценивали по содержанию в пробе нитроформазана, окрашенного продукта восстановления нитротетразолия супероксидными радикалами. Маркером активности глутатионпероксидазы служило содержание восстановленного глутатиона

(цветная реакция с реактивом Элмана). Результаты выражали в процентах, рассчитывая по формуле $[(E_k - E_0)/E_k] \times 100 \%$, где E_k и E_0 – оптическая плотность контрольной и опытной проб соответственно.

Морфологическое исследование почек крыс производили с использованием светооптической микроскопии. В качестве фиксирующей жидкости применяли 10% раствор формалина. Для оценки изменений коркового и мозгового вещества почки срезы ткани толщиной 4–6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. На срезах толщиной 10–15 мкм гистохимическим методом Косса определяли наличие соединений кальция. В результате фиксируются отложения кальция черного цвета, ядра – красные, остальные тканевые структуры – розовые. Увеличение $\times 100$, $\times 400$.

Полученные результаты обрабатывали статистическим методом вариационных рядов с использованием критерия Стьюдента; результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое, m – ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

Применение этиленгликоля на протяжении 6 недель привело к развитию у всех животных контрольной группы выраженного оксалатного нефролитиаза. Показатели экскреторной функции почек у этих крыс представлены в **таблице 1**. Из **таблицы 1** видно, что длительное потребление ЭГ обусловило существенное увеличение выделения с мочой ионов оксалата. Так, если в интактных пробах мочи они не обнаруживались, то уже к концу первой недели эксперимента почками экскретировалось почти 6 мг/сутки аниона щавелевой кислоты. Затем на протяжении последующих недель наблюдалось выраженное усиление оксалурии, в результате чего к окончанию опыта величина описываемого показателя возросла до 9–10 мг/сутки. Экскреция фосфат-ионов не претерпевала существенных изменений, в течение всего периода наблюдений варьируя в диапазоне 40–50 мг/сутки, что, по всей видимости, было обусловлено некоторыми колебаниями скорости клубочковой фильтрации.

На этом фоне в моче подопытных животных был зафиксирован значительный рост активности маркерных ферментов, отражающих наличие повреждения почечного эпителия (**табл. 1**). Так, на протяжении первых 3 недель активность ЛДГ постепенно увеличивалась, превысив в результате исходный уровень в 5,6 раза. Затем к исходу 5 и 6 недель активность ЛДГ в моче несколько снижалась, хотя по-прежнему многократно превосходила показатели интактных крыс. Динамические изменения активности ГГТ и НАГ носили сходный характер – выраженный рост на протяжении всего опыта, в результате которого активность этих энзимов увеличивалась в 2,1 и 4,7 раза соответственно.

Одновременно в почечной ткани животных контрольной группы были зафиксированы характерные признаки развития окислительного стресса (**табл. 2**).

В первую очередь на это указывают значительное увеличение (на 12,5 %) общей прооксидантной активности и почти двукратный рост концентрации в почечном гомогенате ТБРП за первые 3 недели опыта ($p < 0,001$). Затем к исходу 6 недель величина обоих показателей снижалась, хотя ОПА по-прежнему существенно превышала значения, характерные для интактных крыс. Заслуживают внимания изменения системы ферментативной защиты почек от свободных радикалов. Так, активность глутатионпероксидазы за 21 день употребления крысами ЭГ снизилась в 1,5 раза, а через 42 дня – в 2,1 раза. Активность каталазы, напротив, несколько возросла. Аналогичные в целом изменения наблюдались и в крови подопытных животных, различаясь лишь по величине абсолютных значений.

Проведенное морфологическое исследование подтвердило факт развития нефролитиаза. На срезах почек крыс, потреблявших ЭГ, отмечено наличие «кальций-позитивного материала» в виде включений неправильной формы часто с выпячиваниями в интерстиций коркового и мозгового вещества почки с преимущественной локализацией в интерстиции почечного сосочка в области его вершины. Морфометрия показала присутствие $11,9 \pm 1,23$ включений в поле зрения. Средний размер Са-позитивных включений составил $3,6 \pm 0,11$ мкм.

Таким образом, у крыс контрольной группы, на протяжении 6 недель потреблявших ЭГ, наблюдалось развитие выраженного оксалатного нефролитиаза.

На этом фоне профилактическое применение ККМА способствовало некоторому снижению интенсивности развития нефролитиаза. В первую очередь об этом свидетельствуют показатели функции почек подопытных животных (**табл. 1**). Из **таблицы 1** видно, что под влиянием препарата изменялась динамика экскреции оксалат-ионов с мочой. Величина этого показателя, один раз установившись на уровне 6–8 мг/сутки, на протяжении всего опыта не проявляла тенденции к росту. Важно отметить, что все это происходило на фоне довольно ощутимого увеличения мочеотделения у крыс, получавших препарат. Это означает, что концентрация ионов $C_2O_4^{2-}$ в моче по сравнению с контролем снижалась. Данный факт является, несомненно, положительным, поскольку именно концентрация оксалата в моче, а не его итоговая экскреция, имеет решающее патогенетическое значение [11].

Рассматривая активность маркерных ферментов в моче крыс, получавших профилактическое введение ККМА, следует отметить, что на протяжении первых 2 недель динамика усиления этой активности сохранялась для всех трех энзимов (**табл. 1**). Однако выраженность данного процесса, измеренная в абсолютных цифрах, была существенно ниже. Более того, к окончанию 3 недель опыта, когда в контроле активность ЛДГ, ГГТ и НАГ достигала своего максимума, на фоне введения препарата эти же показатели, напротив, снижались.

Таблица 1
Экскреторная функция почек в ходе изучения влияния культуры клеток Маакии амурской на течение экспериментального нефролитиаза

	Диурез, мл/сутки	Экскреция оксалат-иона, мг/сутки	Экскреция фосфат-иона, мг/сутки	Экскреция креатинина, мкмоль/сутки	Активность ЛДГ, ед./мг креатинина	Активность ГГТ, ед./мг креатинина	Активность НАГ, ед./мг креатинина 10 ⁻³
Интактные крысы	6,5 ± 0,53	0 ± 0	43,6 ± 2,93	6,1 ± 0,80	0,14 ± 0,018	0,25 ± 0,022	9,0 ± 0,5
Контроль							
1-я неделя	6,5 ± 0,72	5,9 ± 0,98*	40,3 ± 3,42	7,0 ± 0,72	0,34 ± 0,028*	0,40 ± 0,031*	32,0 ± 2,5*
2-я неделя	6,4 ± 0,60	4,7 ± 0,49*	47,9 ± 4,97	7,1 ± 0,72	0,76 ± 0,015*	Не определялась	33,0 ± 1,5*
3-я неделя	6,2 ± 0,58	5,3 ± 0,61*	51,3 ± 4,08	7,9 ± 0,67	0,79 ± 0,017*	0,40 ± 0,014*	42,0 ± 4,5*
5-я неделя	9,9 ± 1,93	9,8 ± 1,41*	44,0 ± 4,50	6,1 ± 0,72	0,47 ± 0,041*	0,52 ± 0,054*	Не определялась
6-я неделя	9,6 ± 1,75	8,7 ± 0,85*	44,8 ± 4,58	6,5 ± 1,46	0,53 ± 0,022*	Не определялась	36,0 ± 3,60
Профилактика							
1-я неделя	6,2 ± 1,37	7,7 ± 1,02*	47,9 ± 4,61	6,8 ± 0,74	0,31 ± 0,025*	0,31 ± 0,036	27,0 ± 0,20*
2-я неделя	7,4 ± 1,28	5,9 ± 0,80*	44,2 ± 4,79	7,1 ± 0,74	0,60 ± 0,027*	0,24 ± 0,026	33,0 ± 0,2*
3-я неделя	8,0 ± 1,11	6,8 ± 0,67*	49,9 ± 4,57	7,2 ± 0,67	0,46 ± 0,014*	0,32 ± 0,018	22,0 ± 1,9*
Лечение							
1-я неделя	7,3 ± 0,84	5,6 ± 0,85*	45,6 ± 4,39	8,0 ± 0,72	0,41 ± 0,020*	0,20 ± 0,013	17,0 ± 1,1*
2-я неделя	11,8 ± 1,16	6,5 ± 0,83*	56,1 ± 4,48	8,6 ± 0,63	0,24 ± 0,019*	0,19 ± 0,022	13,0 ± 1,5
3-я неделя	11,0 ± 2,09	6,3 ± 0,75*	44,9 ± 4,62	7,0 ± 0,76	0,17 ± 0,013	0,22 ± 0,034	9,0 ± 0,9

Примечание: здесь и в табл. 2: * — достоверные изменения относительно интактных значений, подчеркнуты достоверные изменения относительно контроля в соответствующий период времени ($p < 0,05$).

Кроме того, в группе профилактического применения ККМА были зафиксированы некоторые изменения активности процессов СРО (табл. 2). В гомогенате почечной ткани наблюдались почти трехкратное снижение концентрации ТБРП, а также рост активности каталазы и супероксиддисмутазы относительно контроля. Остальные показатели СРО существенных изменений не претерпевали. В крови крыс профилактической группы было зарегистрировано достоверное усиление активности супероксиддисмутазы и увеличение ОАА, в то время как остальные параметры находились примерно на одном уровне.

Таким образом, профилактическое применение ККМА в определенной степени ослабляет выраженность диагностических признаков экспериментального нефролитиаза. В основном это относится к почечной экскреции оксалат-ионов, активности маркерных ферментов повреждения уротелия, а также к процессам СРО. Тем не менее, морфологические исследования не выявили существенных различий в размере кальциевых депозитов, откладывающихся в почках, а их количество даже несколько увеличилось.

Наиболее существенные благоприятные изменения были получены при изучении лечебного действия препарата ККМА. Оказалось, что в этих условиях резко снижается интенсивность почечной экскреции оксалат-ионов (табл. 1). Так, если в контроле на пике активности указанного процесса с мочой выделялось $9,8 \pm 1,41$ мг/сутки ионов оксалата, то в группе лечения — лишь $6,5 \pm 0,83$ мг/сутки ($p < 0,05$).

Важнейшим показателем, демонстрирующим терапевтическую эффективность ККМА, явилась динамика ферментурии, которая характеризовалась выраженным последовательным снижением активности всех трех определяемых энзимов. Так, за время лечения активность ЛДГ уменьшилась в 4,6 раза, ГГТ — в 1,8 раза, НАГ — в 7 раз. Регресс ферментативной активности в процессе лечения был настолько мощным, что в итоге она снизилась до уровня, соответствующего значениям, характерным для здоровых животных.

Дополнительную информацию относительно антилитогенных свойств ККМА дает анализ показателей активности процессов СРО (табл. 2). Как в почках, так и в крови подопытных животных наблюдались схожие изменения — достоверные уменьшение ОПА, концентрации ТБРП и ОАА, а также рост активности супероксиддисмутазы.

Наконец, подтверждения ослабления выраженности нефролитиаза в условиях терапии препаратом ККМА были получены в ходе морфометрического исследования. Установлено, что количество кальциевых депозитов в поле зрения снижалось в 1,7 раза (с $11,9 \pm 1,23$ в контроле до $7,1 \pm 0,57$ в группе лечения, $p = 0,002$), а их размер уменьшался на 47 % ($3,6 \pm 0,11$ мкм против $1,9 \pm 0,09$ мкм, $p < 0,001$).

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что в контрольной группе, где крысы на протяжении 6 недель получали ЭГ, у всех животных наблюдалось развитие выраженного оксалатного нефролитиаза, который сопровождался всеми описанными выше характерными явлениями.

На этом фоне профилактическое применение ККМА обусловило некоторое ослабление развития патологического процесса. Показательными признаками эффективности препарата можно считать снижение почечной экскреции оксалат-ионов, а также определенное сдерживание нарастания каталитической активности маркерных ферментов. Кроме того, в меньшей степени активизировались процессы СРО. Правда, морфологическое исследование не выявило каких-либо признаков ослабления литогенеза. Учитывая это, можно сказать, что профилактическое применение ККМА, по-видимому, способно лишь уменьшить тяжесть протекания нефролитиаза, но не предотвратить сам факт его формирования.

По результатам исследования лечебного действия испытуемого препарата были выявлены существенные признаки облегчения патологического процесса. В ходе лечения было зафиксировано достоверное ослабление оксалурии, ярко выраженное последовательное снижение активности всех трех маркерных ферментов вплоть до уровня, соответствующего интактным показателям здоровых крыс, ослабление окислительного стресса, и, наконец, почти двукратное уменьшение размеров кальциевых отложений и их количества.

Анализируя полученные данные, мы поставили перед собой вполне логичный вопрос: как можно интерпретировать столь интересные и в чем-то даже неожиданные результаты? Совершенно очевидно, что ККМА обладает мощным лечебным эффектом, который выражен гораздо сильнее, чем профилактический. Возможно, данный факт объясняется следующим образом. Как уже отмечалось выше, принципиальная идея изучения антилитогенных свойств ККМА базировалась на теоретически обоснованной способности лектинов, входящих в состав данного препарата, блокировать один из главных стимуляторов литогенеза — сialовую кислоту. Sialовая кислота, заякоренная на мембране клеток уротелия, имея при этом высокий отрицательный заряд, за счет физико-химического взаимодействия притягивает положительно заряженную часть биоминералов вевеллита ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), способствуя тем самым их адгезии к гликокаликсу нефроцитов [4]. Но здесь есть одна очень важная особенность: взаимодействие СК с кристаллами определяется не столько ее количеством, сколько трехмерной организацией молекул СК в пространстве. При этом известно, что нормальные здоровые клетки содержат очень много СК, но она настолько плотно упакована, что практически не имеет возможности прореагировать с кристаллическим материалом. В то же время развивающиеся клетки, находящиеся в стадии пролифе-

Таблица 2

Показатели активности свободнорадикального окисления
в ходе изучения влияния культуры клеток Маакии амурской на течение экспериментального нефролитиаза

	Содержание ТБРП, мкмоль	ОПА, %	Активность каталазы, %	Активность супероксиддисмутазы, %	Активность глутатионпероксидазы, %	ОАА, %
Почки						
Интактные крысы	7,3 ± 0,40	54,3 ± 2,36	13,2 ± 0,66	19,6 ± 1,85	45,2 ± 1,89	20,9 ± 2,69
Контроль						
3 недели	12,9 ± 1,03*	66,8 ± 1,67*	15,5 ± 1,06	18,4 ± 1,90	30,1 ± 1,85*	18,2 ± 1,73
6 недель	5,1 ± 0,30	63,0 ± 1,17*	23,3 ± 1,31*	19,7 ± 2,18	21,8 ± 1,44*	16,0 ± 0,92
Профилактика	3,7 ± 0,12*	68,9 ± 1,67	26,2 ± 1,74*	27,0 ± 2,82*	25,1 ± 0,89*	19,9 ± 1,54
Лечение	2,2 ± 0,17*	27,4 ± 0,97*	20,4 ± 1,24*	30,8 ± 1,23*	18,0 ± 0,92*	12,5 ± 0,76*
Кровь						
Интактные крысы	2,5 ± 0,18	45,5 ± 1,06	12,2 ± 1,27	16,9 ± 0,82	57,8 ± 2,04	73,7 ± 0,52
Контроль						
3 недели	3,9 ± 0,42*	73,4 ± 0,92*	22,0 ± 1,99*	16,4 ± 1,99	32,3 ± 3,29*	60,1 ± 1,17*
6 недель	3,7 ± 0,15*	60,2 ± 3,76*	28,0 ± 3,07*	15,6 ± 2,32	30,1 ± 2,46*	70,9 ± 1,39
Профилактика	3,4 ± 0,31	72,8 ± 0,79	23,7 ± 2,10	49,9 ± 3,52*	39,4 ± 1,37	67,7 ± 1,59*
Лечение	2,0 ± 0,31*	31,9 ± 1,67*	22,0 ± 2,65	37,3 ± 1,76*	36,1 ± 2,14	42,9 ± 1,18*

рации, специализированы в меньшей степени, но трехмерная структура СК у этих клеток комплементарна структуре кристаллической решетки вееллита, что создает условия для его адгезии [4]. Поэтому мы предполагаем, что на пике развития экспериментального нефролитиаза, вызванного трехнедельным потреблением крысами ЭГ, когда наблюдается максимально выраженное повреждение клеток уротелия, начинается компенсаторная адаптивная пролиферация нефроцитов, сопровождающаяся реорганизацией трехмерной структуры СК. В результате свободные карбоксильные группы СК «выпячиваются» в мочевое пространство, что, с одной стороны, вроде бы создает условия для адгезии кристаллов, но, с другой стороны, возникает подходящая «мишень» для действия лектинов ККМА. Эти лектины специфически связываются с СК, прикрепленной к галактозе в положениях α -2,3, блокируя тем самым взаимодействие «кристалл – клетка» [4, 5]. А это, в свою очередь, значительно ослабляет проникновение кристаллов в ткани и помогает клеткам восстановить свои нормальные структуру и функции. В условиях же профилактического введения препарата, по всей видимости, плотно упакованная СК пока еще не столь поврежденных клеток просто не имеет свободных группировок, пригодных для взаимодействия с лектинами, и поэтому выраженного антилитогенного действия не возникает.

Вместе с тем состав биологически активных веществ ККМА, способных ослабить камнеобразование, вряд ли ограничивается только лектинами. Не исключено, что целый спектр разнообразных компонентов этого химического состава так или иначе может оказать влияние на течение нефролитиаза. Например, обращает на себя внимание тот факт, что и в группе профилактики, и особенно в группе лечения, было зафиксировано снижение почечной экскреции оксалатов. По всей видимости, это можно объяснить тем, что некоторые биологически активные вещества ККМА ингибируют лактатдегидрогеназу в печени, ослабляя тем самым синтез оксалат-ионов. Как известно, этот фермент в гепатоцитах катализирует превращение глиоксалевой кислоты в оксалат [8]. Вместе с тем в целом ряде работ показано, что разнообразные вещества, обладающие способностью взаимодействовать с SH-группами данного энзима, существенно ослабляют его активность [12, 13]. Не исключено, что подобное явление наблюдалось и в наших экспериментах.

Положительным свойством препарата ККМА является его антирадикальная активность. В обеих экспериментальных группах мы наблюдали ярко выраженное ингибирование процессов перекисного окисления липидов, маркерами которого являются ТБРП и ОПА. Из полученных результатов следует, что в основе механизма данного действия лежит как активация ферментативного подавления СРО, так и стимуляция неферментных компонентов антиоксидантной защиты почек и кро-

ви. Учитывая тот факт, что процессы СРО вносят весьма существенный вклад в развитие нефролитиаза, способность ККМА подавлять СРО можно отнести к еще одному механизму ее антилитогенного эффекта.

Подытоживая вышесказанное, отметим, что ККМА обладает выраженным антилитогенным действием, которое в максимальной степени проявляется в условиях лечебного применения препарата. В основе механизма указанного действия, вероятно, лежит ингибирование СК, нарушение синтеза оксалат-ионов в печени, а также подавление процессов СРО.

Заключение

Длительное применение ККМА на фоне экспериментального нефролитиаза сопровождается выраженным лечебным эффектом. Профилактическое применение препарата в некоторой степени ослабляет тяжесть развивающегося заболевания.

Список литературы

1. Тиктинский О.Л., Александров В.П. Мочекаменная болезнь. СПб.: Питер, 2000. 384 с.
Tiktinsky O.L., Alexandrov V.P. Kidney stone disease. SPb.: Piter, 2000. 384 p.
2. Brikowski T.H., Lotan Y., Pearle M.S. Climate-related increase in the prevalence of urolithiasis in the United States // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. 105. 9841–9846.
3. Coe F.L., Evan A., Worcester E. Kidney stone disease // *J. Clin. Invest.* 2005. 115. (10). 2598–2608.
4. Жариков А.Ю., Брюханов В.М., Зверев Я.Ф., Лампатов В.В. Современные представления о модуляторах оксалатного нефролитиаза. I. Стимуляторы кристаллизации // *Нефрология*. 2009. 13. (1). 56–72.
Zharikov A.Yu., Bruykanov V.M., Zverev Ya.F., Lampatov V.V. Modern knowledge of oxalate nephrolithiasis's modulators. I. Promoters of crystallization // Nephrology. 2009. 13. (1). 56–72.
5. Verkoelen C.F., Van Der Boom G.B., Kok D.J., Romijn J.C. Sialic acid and crystal binding // *Kidney Int.* 2000. 57. 1072–1082.
6. Максимов О.Б., Кулеш Н.И., Федореев С.А. и др. Природные антиоксиданты // *Вестник ДВО РАН*. 1996. (1). 45–50.
Maximov O.B., Kulesh N.I., Fedoreev S.A. et al. Nature's antioxidants // Vestnick DVO RAN. 1996. (1). 45–50.
7. Thamilselvan S., Khan S.R., Menon M. Oxalate and calcium oxalate mediated free radical toxicity in renal epithelial cells: effect of antioxidants // *Urol. Res.* 2003. 31. (1). 3–9.
8. Жариков А.Ю., Брюханов В.М., Зверев Я.Ф., Лампатов В.В. Современные методы моделирования оксалатного нефролитиаза // *Нефрология*. 2008. 12. (4). 33–36.
Zharikov A.Yu., Bruykanov V.M., Zverev Ya.F., Lampatov V.V. Modern methods of oxalate's nephrolithiasis modeling // Nephrology. 2008. 12. (4). 33–36.

9. Брюханов В.М., Зверев Я.Ф., Лампатов В.В. и др. Функция почек в условиях экспериментального оксалатного нефролитиаза // Нефрология. 2008. 12. (1). 69–74.

Bryukhanov V.M., Zverev Ya.F., Lampatov V.V. *et al.* Renal functions at the experimental oxalate's nephrolithiasis // Nephrology. 2008. 12. (1). 69–74.

10. Maruch D. Rapid colorimetric assay of β -galactosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase in human urine // Clin. Chim. Acta. 1976. 73. 453–446.

11. Зверев Я.Ф., Брюханов В.М., Лампатов В.В., Жариков А.Ю. Современные представления о роли физико-химических факторов в патогенезе кальциевого нефролитиаза // Нефрология. 2009. 13. (1). 39–50.

Zverev Ya.F., Bryukhanov V.M., Lampatov V.V., Zharikov A.Yu. Modern knowledge of physical and chemical factors role into the pathogenesis of calcium nephrolithiasis // Nephrology. 2009. 13. (1). 39–50.

12. Sharma V., Schwille P.O. Sulfite inhibits oxalate production from glycolate and glyoxylate *in vitro* and from dichloroacetate infused i.v. into male rats // Biochem. Med. Metab. Biol. 1993. 49. (2). 265–269.

13. Baker P.W., Bais R., Rofe A.M. Formation of the L-cysteine-glyoxylate adduct is the mechanism by which L-cysteine decreases oxalate production from glycolate in rat hepatocytes // Biochem. J. 1994. 15. (302). 753–757.

THE INFLUENCE OF MAAKIA AMURENSIS CELL'S CULTURE ON THE EXPERIMENTAL OXALATE NEPHROLITHIASIS

Valery Mikhajlovich BRYUKHANOV¹, Victor Pavlovich BULGAKOV², Alexander Yurjevich ZHARIKOV¹, Olga Vasylyevna AZAROVA¹, Olga Sergeevna TALALAEVA¹, Natalya Vladimirovna MOTINA¹, Ecaterina Victorovna GRIGORUK³

¹Altay State Medical University of Roszdrav
656038, Barnaul, Lenin av., 40

²Institute of Biology and Soil Science of DVO RAN
690022, Vladivostok, 100 years to Vladivostok av., 159

³Pacific Ocean's Institute of Bioorganic Chemistry of DVO RAN
690022, Vladivostok, 100 years to Vladivostok av., 159

The aim of present investigation was studying of *Maackia amurensis* cell's culture's (MACC) influence on the experimental oxalate nephrolithiasis. This drug was synthesized in result of complex biotechnology process in the Institute of biology and ground of DVO RAN. Experiments were performed on 60 male Wistar rats, which were divided on 3 groups. In control group during 6 weeks was given 1% solution of ethylenglycole as a drink for rats. In therapy group during 6 weeks was given ethylenglycole and from the 4 week was being administrated MACC in dose 10 mg/kg. In prophylactic group during 3 weeks used EG and at the same time was being drug's administrated. Chronic use of ethylenglycole in control group has resulted in oxalate nephrolithiasis progression which was indicated by hyperoxaluria, enhancing of marker enzymes (lactate dehydrogenase, γ -glutamyl transferase, N-acetyl- β -D-glucose aminidase) activity, activation of oxidative stress in the kidney and in the blood, and forming calcium deposits near renal papilla. Prophylactic administration of MACC led to the some decrease of oxalate's renal excretion, to the reduction of marker enzymes activity and to the some preventing of free radicals synthesis. These results demonstrate relief of pathological processes. Nevertheless, morphological researches did not found any differences in calcium's deposits's sizes and number between control's and prophylactic's groups. Treatment of experimental nephrolithiasis by MACC led to the great sanitation. It was indicated by the significant reduction of oxaluria, pronounced decrease of marker enzymes activity: LDH, GGT, NAG, and reduction of oxidative stress. Finally, it was confirmed by morphological studies, which detected very significant reduction of calcium's deposits's number and their sizes. On results of present research was discovered the great *Maackia amurensis* cell's culture's therapeutically effect on the experimental oxalate's nephrolithiasis. Prophylactic administration of MACC can some relief pathological processes, but did not prevent their.

Key words: nephrolithiasis, *Maackia amurensis*, treatment, prophylactic.

Bryukhanov V.M. — doctor of medical sciences, professor, rector, e-mail: rector@asmu.ru

Bulgakov V.P. — doctor of biological sciences, head of the department for of biotechnology, corresponding member of RAS, e-mail: bulgakov@ibss.dvo.ru

Zharikov A.Yu. — candidate of biological sciences, assistant of the chair for pharmacology, e-mail: zharikov_a_y@mail.ru

Azarova O.V. — candidate of biological sciences, assistant professor, head of the chair for general chemistry, e-mail: kunaza@rol.ru

Talalaeva O.S. — candidate of medical sciences, assistant of the chair for pharmacology, e-mail: talalaeva_olga@mail.ru

Motina N.V. — assistant of the chair for histology

Grigoruk E.V. — post-graduate student