

ФАРМАКОЛОГИЯ ВЫДЕЛИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ МОЧЕКАМЕННОЙ БОЛЕЗНИ НА РАЗЛИЧНЫХ МОДЕЛЯХ ПОРАЖЕНИЯ ПОЧЕК У КРЫС

А. П. Трашков¹, А. Г. Васильев¹, А. Л. Коваленко², Н. С. Тагиров¹

В экспериментальном исследовании с использованием 2 моделей мочекаменной болезни (МКБ) на 108 крысах-самцах оценивали нефропротекторный эффект метаболитического препарата ремаксол. Моделирование поражения почек производили путем замены питьевой воды на растворы этиленгликоля и фруктозы. Исследовали эффективность ремаксола (14 мл/кг), вводимого внутривенно в течение 10 дней. Обе модели МКБ демонстрировали значительные нарушения со стороны органов мочевыделительной системы, в т.ч. образование микроконкрементов в почках, выраженность которых была максимальной при этиленгликолевой модели и умеренной — при фруктозоиндуцированной. Метаболическая коррекция указанных нарушений оказала выраженное нефропротекторное действие, что проявлялось в нормализации содержания общего белка в плазме крови и уменьшении протеинурии, устранении гипергликемии и глюкозурии и снижении концентрации креатинина и мочевины в плазме крови крыс в обеих используемых моделях.

Ключевые слова: мочекаменная болезнь; экспериментальная модель уролитиаза; метаболитические препараты; нефропротекция; ремаксол; крысы.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема мочекаменной болезни (МКБ) остается актуальной вследствие неуклонного роста встречаемости этого заболевания, который ежегодно в среднем составляет 0,5–5,3% во всех возрастных группах [7, 8]. У более 70% пациентов заболевание диагностируется в возрасте 30–60 лет, при этом подавляющее число больных МКБ составляют мужчины [3]. Значительная распространенность этого заболевания (более 5% населения индустриально развитых стран), объективные трудности ранней диагностики и профилактики делают актуальной проблему изучения его этиологии и патогенеза, поиска новых высокоэффективных способов лечения уролитиаза [5]. В настоящее время не существует единой теории, объясняющей все причины возникновения МКБ, и механизмы ее развития представляются не до конца понятными.

МКБ является полиэтиологическим заболеванием, в развитии и прогрессировании которого выделяют 2 группы факторов — экзогенные (гиподинамия, алиментарная нагрузка, неблагоприятная экология и др.) и эндогенные (наследственные метаболитические нарушения, эндокринные заболевания, пороки развития почек и др.). Значительная часть современных исследований проблемы уролитиаза посвящена вопросам связи этого заболевания с метаболитическим синдромом и поиску

патогенетически обоснованных методов его профилактики и терапии [1, 2, 6].

Одним из перспективных направлений целенаправленного влияния на патогенез МКБ является использование метаболитических препаратов, действие которых направлено на нормализацию обмена веществ, восстановление парциальных функций почек и профилактики осложнений заболевания. Сопровождающие острый период МКБ гипоксия, перекисное окисление биологических макромолекул, воспаление являются прямым показанием к назначению, в том числе с профилактической целью, энергокорректирующей, антиоксидантной и антигипоксикантной терапии. Вместе с тем проблеме метаболитической коррекции проявлений МКБ посвящено сравнительно мало клинических исследований, патофизиологические критерии ее применения не описаны, а влияние на отдельные компоненты патогенеза поражений почек практически не отражено в литературе.

Целью нашего исследования являлось изучение влияния инфузионного метаболитического препарата на основе янтарной кислоты (меглюмина натрия сукцинат + инозин + никотинамид + метионин — торговое наименование “Ремаксол”) на течение МКБ у крыс на моделях отравления этиленгликолем и длительной углеводной нагрузки. Несмотря на широкое применение ремаксола в клинической практике, его использование в урологии и нефрологии зачастую носит эмпирический характер и определяется личным опытом врача, что не позволяет в полной мере оценить эффективность этого препарата. Экспериментальное моделиро-

¹ ГБОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург.

² ФМБА ФГБУН “Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства”, Санкт-Петербург.

вание МКБ позволяет наблюдать за развитием патологического процесса от самого начала; кроме того, эксперимент позволяет воспроизводить режимы и интенсивность воздействия на организм животного, а также такие методы исследования, которые невозможны в клинике.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включено 108 самцов альбиносов серых крыс Вистар (*Rattus norvegicus*, John Berkenhout, 1769) массой тела на момент включения в эксперимент 220–240 г. Животные получены из ФГУП ПЛЖ “Рапполово” РАМН (Ленинградская область). Крысы после поступления из питомника проходили 14-дневный период карантина в карантинном блоке вивария с целью исключения из эксперимента животных с соматической и/или инфекционной патологией.

Исследование выполнено в соответствии с “Правилами лабораторной практики” (Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н), ГОСТ Р 53434-2009 “Принципы надлежащей лабораторной практики” (Приказ Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 02 декабря 2009 г. № 544-ст) и локальными актами СПбГПМУ, регламентирующими проведение научно-исследовательских работ с использованием лабораторных животных. Этические принципы обращения с животными соблюдались в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986).

В исследовании использовали 2 модели МКБ — этиленгликолевую (добавление в питьевую воду на протяжении 37 сут 1 % раствора этиленгликоля [4]) и фруктозоиндуцируемую (добавление в питьевую воду на протяжении 37 сут 10 % раствора фруктозы). Терапию МКБ осуществляли путем ежедневного однократного внутривенного введения метаболического препарата “Ремаксол” (производитель ООО “НТФФ ПОЛИ-САН”) в дозе 14 мл/кг со скоростью не более 2 мл/мин на протяжении 10 сут.

Рандомизацию животных осуществляли методом случайных чисел. Было сформировано 5 экспериментальных групп:

1. “Контроль” ($n = 12$) – здоровые интактные крысы, у которых производили оценку изучаемых показателей для расчета фоновых, референсных значений (“нормальные показатели”).
2. “Этиленгликолевый нефролитиаз” ($n = 24$) – крысы, у которых моделировали развитие МКБ путем отравления этиленгликолем.
3. “Фруктозоиндуцированный нефролитиаз” ($n = 24$) – крысы, у которых моделировали развитие МКБ путем длительной углеводной нагрузки.

4. “Этиленгликолевый нефролитиаз + лечение” ($n = 24$) – крысы, у которых моделировали развитие МКБ путем отравления этиленгликолем и с 28 сут эксперимента начинали 10-дневную инфузионную терапию.

5. “Фруктозоиндуцированный нефролитиаз + лечение” ($n = 24$) – крысы, у которых моделировали развитие МКБ путем длительной углеводной нагрузки и с 28 сут эксперимента начинали 10-дневную инфузионную терапию.

Тяжесть патологического процесса и эффективность проводимого лекарственного воздействия оценивали на 28 и 37 сут эксперимента. Перед выведением из эксперимента всех животных взвешивали, в указанных контрольных точках помещали в метаболические клетки, осуществляли сбор мочи за 12 ч, после чего производили взятие крови и тканей почек. Взятие крови производили путем транскутанной пункции сердца крысы в вакуумные системы Monovette (Германия) в объеме 6 мл. После процедуры взятия крови животные подвергались эвтаназии и аутопсии. Все манипуляции с животными проводили в условиях золептилового наркоза.

Исследование крови осуществляли сразу после ее взятия. Для получения обогащенной тромбоцитами плазмы центрифугировали кровь с ускорением 240 g в течение 7 мин, после чего переносили плазму в другую пластиковую пробирку. Обогащенную тромбоцитами плазму получали из обогащенной путем центрифугирования с ускорением 1200 g в течение 15 мин и последующим перенесением плазмы в другую пластиковую пробирку.

Исследование мочи и крови осуществляли *ex tempore*. Оценивали суточный диурез, относительную плотность мочи, эритроциты в моче, концентрацию белка, глюкозы в крови и моче, содержание креатинина и мочевины в крови.

Фиксацию фрагментов почек крыс и их гистологическую обработку производили общепринятыми методами на 37 сут исследования. Окрашивали обзорные препараты гематоксилином и эозином. Выявление кальциевых микроконкрементов осуществляли методом Косса. Морфологическое исследование производили светооптическим методом.

Статистическую обработку проводили при помощи пакета программ SPSS for Windows. Данные приведены в виде $M \pm SE$ (средняя арифметическая \pm ошибка средней арифметической). Характер распределения данных проверяли, рассчитывая критерий Колмогорова – Смирнова. Сравнение средних данных независимых выборок осуществляли при помощи *t*-критерия Стьюдента (при нормальном характере распределения вариант в выборочной совокупности) и *U*-критерия Манна-Уитни (при распределении вариант в выборочной совокупности, отличном от нормального). Сравнение средних данных зависимых выборок осуществляли при помощи критерия Вилкоксона. Достоверным

Таблица 1. Влияние метаболической терапии (“Ремаксол” в дозе 14 мл/кг на протяжении 10 сут) на динамику биохимических показателей крови, характеризующих функциональное состояние почек крыс с МКБ ($M \pm SE$)

Группа	Сутки	n	Исследуемые показатели			
			Общий белок, г/л	Глюкоза, ммоль/л	Креатинин, мкмоль/л	Мочевина, ммоль/л
Контроль	–	12	65,9 ± 2,15	6,8 ± 0,33	64,0 ± 5,10	6,2 ± 0,95
Этиленгликолевый нефролитиаз	28	11	37,1 ± 3,85 ¹	11,5 ± 1,10 ¹	104,6 ± 21,34 ¹	9,3 ± 1,07 ¹
	37	12	42,8 ± 2,24 ¹	17,0 ± 2,14 ¹	140,2 ± 15,80 ¹	11,1 ± 1,24 ¹
Фруктозоиндуцированный нефролитиаз	28	12	65,0 ± 0,71 ²	7,0 ± 0,51 ²	73,1 ± 6,62 ²	7,7 ± 1,10
	37	12	67,1 ± 1,34 ²	7,6 ± 0,47 ²	90,4 ± 5,31 ^{1,2}	7,9 ± 0,88 ²
Этиленгликолевый нефролитиаз + лечение	28	12	44,6 ± 4,17 ¹	8,9 ± 1,17 ¹	99,2 ± 11,71 ¹	9,5 ± 1,25 ¹
	37	12	52,0 ± 3,03 ^{1,2}	9,2 ± 2,55 ²	96,4 ± 9,06 ^{1,2}	9,0 ± 0,77 ¹
Фруктозоиндуцированный нефролитиаз + лечение	28	12	66,3 ± 0,91	6,5 ± 0,37	69,0 ± 7,76	7,5 ± 1,07
	37	12	66,0 ± 1,55	6,7 ± 0,45	71,0 ± 6,09 ³	6,9 ± 1,15

n — объем выборки;

¹ — отличия от контрольных значений достоверны ($p < 0,05$);

² — отличия от значений группы “Этиленгликолевый нефролитиаз” достоверны ($p < 0,05$);

³ — отличия от значений группы “Фруктозоиндуцированный нефролитиаз” достоверны ($p < 0,05$).

уровнем отличий принимали вероятность не менее 95 % ($p < 0,05$), что является стандартом в медико-биологических исследованиях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Моделирование МКБ путем добавления этиленгликоля или фруктозы в питьевую воду приводило к развитию значительных нарушений со стороны органов мочевыделительной системы. Выраженность этих нарушений зависела от методики моделирования патологического процесса и была максимальной в группах животных, получавших этиленгликоль, и умеренной — в группах животных, получавших 10 % раствор фруктозы вместо питьевой воды (табл. 1, 2; рисунок).

Напряженность патологического процесса в обеих исследуемых моделях МКБ была удовлетворительной, что подтверждается практически полным отсутствием

летальности подопытных животных и умеренной динамикой морфометрических показателей. За весь период наблюдений погибло только 1 животное в группе “Этиленгликолевый нефролитиаз”. Учитывая, что его смерть наступила на вторые сутки после начала эксперимента, прямая связь с моделированием МКБ представляется сомнительной.

Различные способы индукции поражения почек у крыс сопровождались разнонаправленными изменениями массы тела. В группе крыс с этиленгликолевой нефропатией средняя масса тела на 28 сут исследования существенно снизилась до (189,5 ± 12,5) г, что было статистически значимо в среднем на 49 г ниже, чем в контрольной группе — (238,5 ± 9,5) г ($p < 0,001$). К 37 сут эксперимента уменьшение массы тела подопытных животных было менее выраженным и составило в среднем 4,5 г [(185,0 ± 9,5) г]. Фармакологиче-

Таблица 2. Влияние метаболической терапии (“Ремаксол” в дозе 14 мл/кг на протяжении 10 сут) на динамику показателей мочи, характеризующих функциональное состояние почек крыс с МКБ

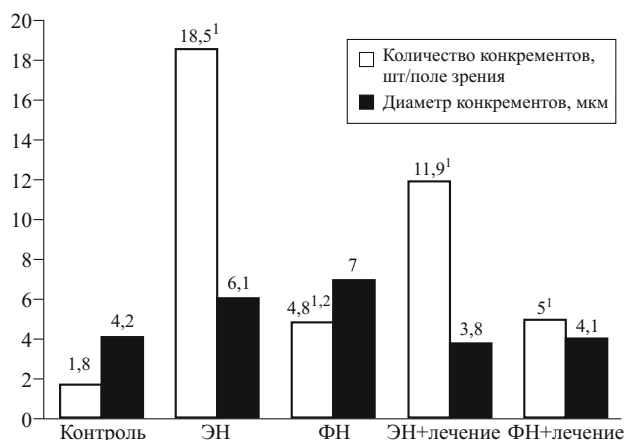
Группа	Сутки	n	Исследуемые показатели				
			Диурез, мл/100 г	Плотность мочи, ед.	Эритроциты, ед./поле зрения	Общий белок, г/л	Глюкоза, ммоль/л
Контроль	–	12	2,9 ± 0,4	1,027 ± 0,010	0 – 1	1,9 ± 0,11	1,2 ± 0,07
Этиленгликолевый нефролитиаз	28	11	2,0 ± 0,2 ¹	0,933 ± 0,082	4 – 9 ¹	16,9 ± 2,38 ¹	6,0 ± 0,18 ¹
	37	12	1,5 ± 0,2 ¹	0,997 ± 0,030	11 – 19 ¹	17,0 ± 4,15 ¹	7,3 ± 1,01 ¹
Фруктозоиндуцированный нефролитиаз	28	12	3,3 ± 0,3	1,019 ± 0,022	1 – 2 ²	4,8 ± 0,80 ^{1,2}	1,4 ± 0,21 ²
	37	12	2,2 ± 0,2 ¹	0,910 ± 0,035 ^{1,2}	1 – 2 ²	5,3 ± 0,71 ^{1,2}	2,0 ± 0,15 ^{1,2}
Этиленгликолевый нефролитиаз + лечение	28	12	2,9 ± 0,2 ²	0,957 ± 0,061	5 – 7 ¹	12,5 ± 3,05 ¹	5,8 ± 0,67 ¹
	37	12	2,6 ± 0,4 ²	1,017 ± 0,025	9 – 10 ¹	7,5 ± 2,01 ^{1,2}	2,7 ± 0,52 ^{1,2}
Фруктозоиндуцированный нефролитиаз + лечение	28	12	3,5 ± 0,4	1,008 ± 0,014	1 – 2	5,1 ± 1,02 ¹	1,7 ± 0,20 ¹
	37	12	2,7 ± 0,2 ³	1,022 ± 0,012 ³	1 – 2	2,2 ± 0,09 ³	1,3 ± 0,22 ³

n — объем выборки;

¹ — отличия от контрольных значений достоверны ($p < 0,05$);

² — отличия от значений группы “Этиленгликолевый нефролитиаз” достоверны ($p < 0,05$);

³ — отличия от значений группы “Фруктозоиндуцированный нефролитиаз” достоверны ($p < 0,05$).



Влияние метаболической терапии на количество и средний размер почечных микроконкрементов у крыс с МКБ.

Примечание: ЭН — этиленгликолевый нефролитиаз, ФН — фруктозоиндуцированный нефролитиаз, ¹ — отличия от контрольных значений достоверны ($p < 0,05$), ² — отличия от значений группы “Этиленгликолевый нефролитиаз” достоверны ($p < 0,05$).

ская поддержка животных с этиленгликолевой нефропатией приводила к незначительной коррекции массы тела, среднее значение которой на фоне применения инфузионной терапии к 37 сут эксперимента недостоверно увеличилась на 14,5 г [(199, 5 ± 12,0) г, $p = 0,204$], оставаясь при этом значительно меньше контрольных значений ($p = 0,003$).

Снижение общей массы тела подопытных крыс при интоксикации этиленгликолем сопровождалось увеличением относительной массы почек, которая составляла (9,8 ± 1,9) мг/100 г массы тела (28 сут) и (9,9 ± 2,3) мг/100 г массы тела (37 сут), что незначительно превышало аналогичный показатель в контрольной группе (8,2 ± 1,1) мг/100 г массы тела животного. Значительной коррекции динамики исследуемого показателя на фоне проводимого лечения не установлено.

Моделирование МКБ с помощью 10 % раствора фруктозы, напротив, приводило к увеличению средней массы тела крыс на 28 сут эксперимента. В указанный период наблюдений этот показатель интенсивности патологического процесса у крыс с МКБ был на 23 г выше ($p = 0,095$), чем у контрольных животных (261,5 ± 7,5) и (238,5 ± 9,5) г, соответственно. К 37 сут эксперимента направление динамики средней массы тела у подопытных животных стало отрицательным (252,0 ± 8,5 г), что свидетельствует об истощении компенсаторных возможностей организма крыс и увеличении степени тяжести заболевания. Применение метаболической терапии не оказало влияния на массу тела животных.

На фоне разнонаправленной динамики общей массы тела крыс с фруктозоиндуцированной нефропатией во всех контрольных точках исследования наблюдалось прогрессирующее увеличение относительной массы почек. На 28 и 37 сут эксперимента она состав-

ляла (8,5 ± 1,3) и (9,7 ± 2,9) мг/100 г массы тела, что существенно превышало контрольное значение (8,2 ± 1,1) мг/100 г массы тела животного. Курс инфузионной терапии в целом способствовал уменьшению относительной массы почек в среднем на 1,4 мг/100 г массы тела крысы до (8,3 ± 0,9) мг/100 г массы тела крысы ($p = 0,371$).

Обоснованность выбора моделей МКБ наиболее ярко подтверждается при анализе основных биохимических параметров крови экспериментальных животных. Из представленных в табл. 1 данных следует, что функция почек у животных, получавших в качестве питьевой воды 1 % раствор этиленгликоля, нарушена в значительно большей степени, чем у животных с фруктозоиндуцированной МКБ, что проявляется более тяжелыми изменениями азотистого и углеводного обменов и развитием гипопроотеинемии.

Применение экспериментальной терапии для коррекции указанных нарушений выявило ее высокую эффективность, что проявлялось в нормализации содержания общего белка, устранении гипергликемии и снижении концентрации креатинина и мочевины в плазме крови крыс на обеих использованных моделях МКБ (табл. 1).

Анализ результатов, полученных при исследовании мочи крыс, выявил серьезные расстройства парциальных функций почек. Степень тяжести этих нарушений была максимальной на модели этиленгликолевого нефролитиаза и умеренной при индукции нефропатии длительной нагрузкой фруктозой (табл. 2).

Интоксикация этиленгликолем приводила к прогрессирующему уменьшению суточного объема мочи, достоверно отличающемуся от нормальных показателей на всем протяжении эксперимента, значительной гематурии, протеинурии и глюкозурии. Выраженность этих показателей на модели фруктозоиндуцированного нефролитиаза была менее глубокой. У животных этой группы также выявлено развитие олигоурического синдрома и умеренное увеличение содержания в моче эритроцитов, общего белка и глюкозы, статистически значимо отличающееся от показателей крыс, получавших этиленгликоль (табл. 2).

10-дневный курс применения ремаксола способствовал существенному улучшению функционального состояния почек животных. Исследуемый препарат обладает диуретическим действием, восстанавливает концентрационную способность почек, реабсорбцию аминокислот и глюкозы в канальцах нефронов. При этом уровень эритроцитов в моче крыс, получавших препарат, оставался высоким, статистически значимо отличающимся от контрольных значений (табл. 2).

Развитие МКБ приводит к характерным для нефролитиаза морфологическим изменениям почек экспериментальных животных. При макроскопическом исследовании существенных различий в строении органов между крысами, получавшими этиленгликоль или фруктозу, не установлено. Почки у нелеченных живот-

ных были увеличены в размерах. Ткани почек отечны, мозговое вещество гиперемировано, в корковом слое отмечалось чередование участков гиперемии и ишемии. Гистологический анализ показал наличие нарушений микроциркуляции, выражающихся в гиперемии мозгового и прилегающих областей коркового слоя. Вены и венулы увеличены в размерах, количество капилляров увеличено. Периваскулярная область умеренно инфильтрирована лейкоцитами. Канальцевый аппарат нефронов существенно не изменен, просвет канальцев местами расширен. Гистохимически в мозговом веществе почек выявляются многочисленные кальциевые микроконкременты, максимальное количество которых было выявлено у животных с этиленгликолем нефролитиазом (рисунок).

Ремаксол оказывает значительное органопротекторное действие, выражающееся в практически полной нормализации картины микроциркуляции в тканях почек. На обеих исследуемых моделях нефролитиаза была выявлена тенденция к снижению скорости камнеобразования на фоне проводимого лечения (рисунок), однако не достигающая статистически значимого уровня.

ВЫВОДЫ

Инфузионная метаболическая терапия экспериментальной МКБ у крыс препаратом ремаксол в дозе

14 мл/кг на протяжении 10 сут способствовала уменьшению интенсивности патологических процессов в почках, что проявлялось быстрым восстановлением работы микроциркуляторного русла, нормализацией механизмов мочеобразования и уменьшением деструктивных процессов в паренхиме органа.

ЛИТЕРАТУРА

1. О. И. Аполихин, С. Ю. Калинин, А. А. Камалов и др., *Саратовский научно-мед. журн.*, 7(2), 117 (2011).
2. А. Б. Батько, *Terramedica*, № 1, 44 – 48 (2013).
3. А. Г. Васильев, Б. К. Комяков, Н. С. Тагиров и др., *Профилактикт. и клин. мед.*, № 4, 183 – 186 (2009).
4. А. Ю. Жариков, Я. Ф. Зверев, В. М. Брюханов и др., *Нефрология*, 13(4), 37 – 50 (2009).
5. Н. С. Тагиров, Т. Х. Назаров, А. Г. Васильев и др., *Профилактикт. и клин. мед.*, № 4, 30 – 33 (2012).
6. Э. К. Яненко, Д. С. Меринов, О. В. Константинова и др., *Эксперим. и клин. урология*, № 3, 19 – 24 (2012).
7. O. S. Indridason, S. Birgisson, V. O. Edvardsson, et al., *Scand. J. Urol. Nephrol.*, 40(3), 215 – 220 (2009).
8. V. Romero, H. Akpınar, D. G. Assimos, *Rev. Urol.*, 12(2 – 3), 86 – 96 (2010).

Поступила 17.02.15

METABOLIC THERAPY OF NEPHROLITHIASIS IN TWO DIFFERENT RAT MODELS OF KIDNEY DISEASE

A. P. Trashkov¹, A. G. Vasiliev¹, A. L. Kovalenko², N. S. Tagirov¹

¹ Saint-Petersburg State Pediatric Medical University

² Toxicological Institute of Federal Medical Biological Agency

108 albino male rats were used in two experimental rat models reproducing urolithiasis for the assessment of metabolic drug medicine Remaxol nephroprotective effect upon the development of this disease. "Ethyleneglycol" model consisted of adding 1 % ethylene glycol solution in drinking water for 37 days and "fructose-induced" one — of adding 10 % fructose solution in drinking water for the same period. Therapy included a 10-day course of daily i.v. injections of Remaxol (14 ml/kg). Both experimental models were successful in producing urolithiasis with considerable disturbances in the structure and functioning of kidneys up to revealing microconcrement formation. The "ethyleneglycol" model proved to cause maximum changes while the "Fructose-induced" model — only moderate ones. Metabolic correction of these changes was successful in nephroprotection effectively normalizing kidney functions and the total protein concentration, eliminating hyperglycemia and reducing creatinine and urea blood plasma concentration in both rat experimental models.

Keywords: urolithiasis; experimental urolithiasis models; metabolic medicines; nephroprotection; Remaxol; rats.