

АНТИЛИТОГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ МЕЛОКСИКАМА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ НЕФРОЛИТИАЗЕ

А. Ю. Жариков, Я. Ф. Зверев, В. М. Брюханов, В. В. Лампатов¹

Эксперименты проведены на самцах нелинейных крыс. Первая (контрольная) группа животных на протяжении 6 недель получала в виде питья 1 % раствор этиленгликоля (ЭГ). Крысам второй (подопытной) группы, начиная с 4-й недели, на фоне продолжающегося потребления ЭГ вводили мелоксикам внутрь в дозе 2,5 мг/кг. Каждые 7 дней в моче, собранной за сутки, определяли концентрацию ионов оксалата, фосфата и кальция, активность маркерных ферментов: лактатдегидрогензы, γ -глутамилтрансферазы и N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы. Гистохимическим методом Косса на почечных срезах крыс определяли наличие кальций-позитивных отложений. Применение мелоксикама обусловило существенное облегчение протекания экспериментального нефролитиаза. Наблюдалось ослабление пересыщения мочи оксалат-ионами и ионами кальция, выраженное снижение ферментурии, а также значительное уменьшение количества кальциевых отложений.

Ключевые слова: экспериментальный нефролитиаз, мелоксикам.

ВВЕДЕНИЕ

Оксалатный нефролитиаз — основная форма мочекаменной болезни (МКБ), поиск новых методов фармакологической коррекции которой сегодня актуален [7].

Образование почечных камней во многом зависит от активности в нефроне ряда белковых макромолекул, одни из которых являются ингибиторами кристаллизации, другие — стимуляторами литогенеза [2, 6]. В условиях патологии баланс сдвигается в сторону последних, что в совокупности с иными причинами обуславливает формирование внутривисцеральных кристаллов [2, 3, 6]. Важную роль в активации стимуляторов литогенеза и подавлении ингибиторов кристаллизации играют почечные простагландины (ПГ), выработка которых регулируется циклооксигеназой-2 (ЦОГ-2), экспрессирующейся в области плотного пятна. Возможно, это реализуется через способность ПГ усиливать экспрессию гиалуронана, который считается главным стимулятором литогенеза [8]. Кроме того, выявлена определенная зависимость между уровнем экспрессии ЦОГ-2 и выработкой модифицированного протеина Тамма-Хорсфалла, который изначально является ингибитором кристаллизации, но после модификации теряет указанные свойства или даже становится стимулятором камнеобразования [9]. Учитывая сказанное, логично было предположить, что перспективным направлением фармакологической коррекции МКБ может стать применение нестероидных противовоспалительных средств, из числа которых нас в большей степени заинтересовал мелоксикам, поскольку он

является относительно избирательным ингибитором ЦОГ-2, в силу чего у данного препарата не столь значительно выражено ulcerогенное действие. Таким образом, целью настоящего исследования стало изучение влияния мелоксикама на течение экспериментального оксалатного нефролитиаза.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 23 самцах нелинейных крыс массой 200–250 г, находившихся в индивидуальных клетках, приспособленных для сбора мочи. Животные были разделены на две группы. В первой (контрольная группа) — 15 крыс с целью моделирования экспериментального нефролитиаза в течение 6 недель получали в виде питья в свободном доступе 1 % раствор этиленгликоля (ЭГ). Данная методика адекватно отражает особенности развития МКБ в организме человека [1]. Животным второй (подопытной группы), также 6 недель потреблявшим ЭГ, начиная с 4-й недели, на протяжении последующих 3 недель вводили внутрь взвесь субстанции мелоксикама в виде 2 % крахмальной слизи в дозе 2,5 мг/кг.

Один раз в неделю осуществляли сбор суточного объема мочи, в которой определяли концентрацию ионов оксалата, фосфата и кальция, а также измеряли экскрецию креатинина. Оксалат-ионы определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии по разработанной в нашей лаборатории методике [4]. Фосфат-ионы определяли методом фотоэлектроколориметрии (ФЭК) по реакции образования окрашенного в желтый цвет фосфорно-молибден-ванадиевого комплекса при длине волны $\lambda = 440$ нм. Определение ионов кальция также проводили методом ФЭК по реакции с о-крезолфталейн-комплексом при длине волны $\lambda = 590$ нм.

¹ Кафедра фармакологии (зав. — проф. В. М. Брюханов) Алтайского государственного медицинского университета, 656038, Барнаул, пр. Ленина, 40.

Кроме того, в собранной моче общепринятыми биохимическими методами измеряли активность маркерных ферментов повреждения почечного эпителия: лактатдегидрогеназы — ЛДГ (характеризует степень цитолиза клеток), γ -глутамилтрансферазы — ГГТ (свидетельствует о степени повреждения клеточных мембран), N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы — НАГ (демонстрирует функциональные нарушения нефроцитов). Активность всех определяемых ферментов рассчитывали относительно концентрации креатинина в моче, выражавшейся в мг/л, и обозначали в условных единицах как U/мг креатинина.

По истечении 6 недель эксперимента крыс обеих групп декапитировали путем дислокации шейного позвонка под эфирным наркозом с соблюдением требований Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2000 г.). У декапитированных крыс производили забор обеих почек, которые служили материалом для морфологического исследования на предмет выявления кальциевых депозитов. В качестве фиксирующей жидкости применяли 10 % раствор формалина. Для оценки количества и размеров кальциевых депозитов срезы ткани толщиной 4 – 6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. На срезах тол-

щиной 10 – 15 мкм гистохимическим методом Косса определяли наличие соединений кальция.

Полученные результаты обрабатывали методом парных сравнений с использованием критерия Манна-Уитни. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M — выборочное среднее, m — ошибка среднего. Разницу сравниваемых значений считали достоверной, если показатель достоверности (p) был меньше 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные эксперименты показали, что шестинедельное применение ЭГ в контрольной группе привело к развитию у всех крыс выраженного оксалатного нефролитиаза, сопровождавшегося характерными биохимическими и морфологическими признаками. Так, уже после первой недели опыта в моче контрольных животных было зафиксировано появление значительного количества оксалат-ионов, чего не наблюдалось до использования ЭГ. Впоследствии величина отмеченного показателя, незначительно варьируя, оставалась стабильно высокой вплоть до конца периода наблюдений (таблица).

На этом фоне динамика мочеотделения и концентрации фосфат-ионов в моче крыс контрольной груп-

Показатели функции почек у крыс при хроническом экспериментальном нефролитиазе и на фоне применения мелоксикама в дозе 2,5 мг/кг

Группа животных	Оксалат-ион, мг/мл	Ионы кальция, мкмоль/мл	Активность ферментов U/мг креатинина в сутки		
			ЛДГ	ГГТ	НАГ
<i>Исходный уровень</i>					
Контроль	–	1,8 ± 0,1	0,18 ± 0,015	0,26 ± 0,015	8,4 ± 0,32
Опыт	–	1,8 ± 0,08	0,25 ± 0,011	0,14 ± 0,019	5,9 ± 0,94
<i>1-я неделя</i>					
Контроль	1,2 ± 0,14*	1,3 ± 0,09*	0,32 ± 0,024*	0,30 ± 0,015	14,4 ± 2,48*
Опыт	2,4 ± 0,38*	2,9 ± 0,43*	0,26 ± 0,019	0,20 ± 0,012*	10,5 ± 0,76*
<i>2-я неделя</i>					
Контроль	1,4 ± 0,13*	1,6 ± 0,22	0,50 ± 0,033*	0,32 ± 0,011*	19,4 ± 1,4*
Опыт	2,1 ± 0,20*	1,4 ± 0,14	0,38 ± 0,026*	0,22 ± 0,017*	10,4 ± 0,045*
<i>3-я неделя</i>					
Контроль	1,3 ± 0,13*	1,9 ± 0,23	0,52 ± 0,032*	0,37 ± 0,015*	20,1 ± 2,11*
Опыт	1,6 ± 0,25*	1,1 ± 0,06*	0,30 ± 0,02*	Не определялось	12,2 ± 1,09*
<i>4-я неделя</i>					
Контроль	1,6 ± 0,16*	1,5 ± 0,1	0,44 ± 0,018*	0,30 ± 0,01	17,2 ± 0,9*
Опыт	0,5 ± 0,11*	1,0 ± 0,09*	0,26 ± 0,025	0,30 ± 0,02*	14,1 ± 0,57*
<i>5-я неделя</i>					
Контроль	1,3 ± 0,12*	1,6 ± 0,06	0,45 ± 0,025*	0,42 ± 0,049*	15,4 ± 1,26*
Опыт	0,3 ± 0,04*	0,7 ± 0,09*	Не определялось	0,27 ± 0,01*	11,2 ± 0,59*
<i>6-я неделя</i>					
Контроль	1,3 ± 0,14*	1,6 ± 0,17	0,53 ± 0,018*	Не определялось	31,9 ± 2,86*
Опыт	0,5 ± 0,13*	0,6 ± 0,04*	0,24 ± 0,03	0,29 ± 0,04*	8,2 ± 0,51

Примечание. * — достоверные изменения внутри групп по сравнению с исходным уровнем ($p < 0,05$); полужирным выделены достоверные отличия между группами ($p < 0,05$).

пы носила разнонаправленный характер: постепенное увеличение диуреза с исходного уровня $5,3 \pm 0,36$ мл/сут до $9 \pm 1,19$ мл/сут после 42-го дня и столь же последовательное снижение мочевой концентрации фосфата с $9,1 \pm 0,38$ мг/мл перед началом применения ЭГ до $6,2 \pm 0,45$ мг/мл к окончанию опыта. Концентрация ионов кальция в моче в течение всего периода заболевания была стабильной, не претерпевая существенных изменений (таблица).

Наглядным показателем прогрессирования экспериментальной патологии на фоне применения ЭГ стала динамика ферментной активности в моче животных контрольной группы. Как следует из таблицы, по ходу эксперимента активность ЛДГ увеличилась в 2,9 раза; ГГТ — в 1,6 раза; НАГ — в 3,8 раза (для всех — $p < 0,001$ относительно исходного уровня).

Результаты морфометрии подтвердили возникновение литогенных процессов в почках контрольных крыс. При этом значительное количество кальциевых депозитов ($27,4 \pm 3,22$ в поле зрения), средний размер которых составил $12 \pm 0,62$ мкм, фиксировалось в области почечного сосочка.

Анализ результатов биохимических исследований образцов мочи подопытных животных выявил, что и во второй группе в первые 3 недели применения ЭГ были зарегистрированы отмеченные выше признаки развития нефролитиаза, среди которых — пресыщение мочи оксалат-ионами и рост активности маркерных ферментов повреждения уротелия.

В этих условиях длительное введение мелоксикама привело к ощутимому облегчению протекания экспериментальной патологии. Как следует из таблицы, значительно снижалась мочевая концентрация оксалат-ионов, в результате чего ее величина во время лечения уступала контрольным значениям в 2,6–4,3 раза ($p < 0,001$). Параллельно на 33–63 % относительно показателей животных контрольной группы уменьшалась концентрация в моче ионов кальция ($p < 0,001$). Динамика диуреза и мочевой концентрации фосфат-ионов в целом соответствовала таковой у контрольных крыс.

Проводимому курсу терапии сопутствовало ослабление ферментной активности в моче подопытных животных. Так, к моменту завершения эксперимента активность ЛДГ была ниже контрольных значений в 2,2 раза; ГГТ — в 1,7 раза; НАГ — в 3,9 раза (для всех — $p < 0,001$).

Наконец, морфологические исследования показали, что средний размер кальциевых депозитов по окончании трехнедельного применения мелоксикама уменьшился относительно контроля на 14,2 %, а их количество снизилось в 5,3 раза (с $27,4 \pm 3,22$ до $5,2 \pm 0,61$ в поле зрения; $p < 0,001$).

В результате проведенных экспериментов установлено, что 6-недельное применение ЭГ спровоцировало развитие выраженного нефролитиаза у всех крыс кон-

трольной группы. Как известно, этиленгликоль — низкомолекулярный двухатомный спирт, метаболизирующийся в печени до щавелевой кислоты. Анионы последней, выделяясь из организма почками, реагируют в нефроне с ионами Ca^{2+} , образуя нерастворимые кристаллы оксалата кальция, которые выпадают в осадок, провоцируя камнеобразование [1]. Кроме того, оксалат-ионы вызывают деструкцию почечного эпителия, активируют процесс свободнорадикального окисления в почках, подавляют ингибиторы кристаллизации и активируют стимуляторы литогенеза [3]. Поэтому столь длительное употребление животными раствора ЭГ ожидаемо инициировало пересыщение мочи оксалатами, повреждение нефроцитов и отложение в области почечного сосочка многочисленных кальциевых депозитов довольно крупного размера.

На этом фоне применение мелоксикама обусловило существенное облегчение протекания экспериментального нефролитиаза у подопытных крыс. Было отмечено значительное снижение мочевой концентрации оксалат-ионов, несмотря на то, что животные подопытной группы, так же как и в контроле, все шесть недель непрерывно потребляли этиленгликоль. Параллельно фиксировалось уменьшение мочевой концентрации катионов кальция. В совокупности эти два эффекта препарата могли существенно ослабить синтез в нефроне кристаллов CaC_2O_4 , снижая тем самым интенсивность пересыщения мочи [5].

Важно отметить, что в результате проведенного курса лечения был в значительной степени нивелирован так называемый “повреждающий фактор”, которому в современной теории литогенеза отводится весьма важная роль. Считается, что адгезия и агрегация кристаллического материала происходит на первичном ядре, возникающем на месте повреждения и/или гибели нефроцитов [3]. Поэтому ярко выраженное уменьшение ферментной активности в моче крыс, получавших препарат, свидетельствует о восстановлении структуры и функции почечных эпителиоцитов, что не могло не отразиться благоприятным образом на течении экспериментальной патологии.

Описанные стороны действия мелоксикама воплотились в пятикратном уменьшении количества кальциевых депозитов в почках, что, несомненно, явилось главным и наиболее весомым результатом лечения. Зафиксированное антилитогенное действие мелоксикама открывает новые перспективы в клиническом применении нестероидных противовоспалительных средств.

ВЫВОД

Применении мелоксикама в качестве средства фармакологической коррекции экспериментального нефролитиаза облегчает течение заболевания за счет ослабления пересыщения мочи, восстановления структуры и функциональной активности почечных клеток, а также уменьшения количества и размеров кальциевых депозитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Ю. Жариков, В. М. Брюханов, Я. Ф. Зверев, В. В. Лампа-тов, *Нефрология*, **12**(4), 28 – 35 (2008).
2. А. Ю. Жариков, В. М. Брюханов, Я. Ф. Зверев, В. В. Лампа-тов, *Нефрология*, **13**(1), 56 – 72 (2009).
3. А. Ю. Жариков, Я. Ф. Зверев, В. М. Брюханов, В. В. Лампа-тов, *Нефрология*, **13**(4), 37 – 50 (2009).
4. А. Ю. Жариков, В. В. Лампа-тов, Я. Ф. Зверев и др., *Клиниче-ская лабораторная диагностика*, № 12, 3 – 5 (2010).
5. Я. Ф. Зверев, В. М. Брюханов, В. В. Лампа-тов, А. Ю. Жари-ков, *Нефрология*, **13**(1), 39 – 50 (2009).
6. Я. Ф. Зверев, А. Ю. Жариков, В. М. Брюханов, В. В. Лампа-тов, *Нефрология*, **14**(1), 29 – 49 (2010).
7. О. Л. Тиктинский, В. П. Александров, *Мочекаменная бо-лезнь*, СПб.: ПИТЕР, (2000).
8. L. Rügheimer, C. Johnsson, C. Maric, P. Hansell, *Acta Physiol (Oxf)*, **193**(2), 191 – 198 (2008).
9. W. Dou, S. Thompson-Jaeger, S. J. F. Lauderkind, et al., *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 289, F49 – F60 (2005).

Поступила 28.06.11

ANTI-LITHOGENIC EFFECT OF MELOXICAM IN EXPERIMENTAL NEPHROLITHIASIS

A. Yu. Zharikov, Ya. F. Zverev, V. M. Bryukhanov, and V. V. Lampatov

Altai State Medical University, pr. Lenina 40, Barnaul, Altai Krai, 656038, Russia

Experiments performed on 23 male rats, were divided into 2 groups. Animals in the control received group 1% solution of ethylene glycol (EG) as a drink during 6 weeks. In the test group, EG was also introduced for 6 weeks, and meloxicam was administered in a dose of 2.5 mg/kg from the 4th week. Every 7 days, daily urine was analyzed for the concentrations of oxalate, phosphate, and calcium and for the activity of urothelium injury marker enzymes including lactate dehydrogenase (LDH), γ -glutamyl transferase (GGT), and N-acetyl- β -D-glucose aminidase (NAG). In addition, sections of the rats kidney were used to detect calcium deposits by histochemical Van Koss method. The treatment of experimental nephrolithiasis by meloxicame led to simplification of pathology, as indicated by a significant reduction in the urine oxalate and calcium concentrations and a pronounced decrease in the activity of all marker enzymes (LDH, GGT, NAG). This was confirmed by morphological studies, which detected very significant reduction in both number and size of calcium deposits.

Key words: Experimental nephrolithiasis, meloxicam