

# Снижение уровня апоптоза и отложения солей при использовании Тутукона в условиях поражения тубулярных клеток почек при гипероксалурии на модели с использованием крыс

Cahit Sahin<sup>1,3</sup>, Sukran Sarikaya<sup>2</sup>, Kayhan Basak<sup>2</sup>, Cihangir Ali Cetinel<sup>1</sup>, Fehmi Narter<sup>1</sup>, Bilal Eryildirim<sup>1</sup>, Erkin Saglam<sup>1</sup>, Kemal Sarica<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Отделение урологии, Научно-исследовательская и обучающая клиника им. Луфти Кидар Картал, Стамбул, Турция

<sup>2</sup>Отделение патологии, Научно-исследовательская и обучающая клиника им. Луфти Кидар Картал, Стамбул, Турция

<sup>3</sup>Gömeç sok. Sabancı-2 Sitesi A1 Kat 4 Daire 24 Acibadem/Kadiköy, Istanbul, Turkey

Статья получена: 9 января 2015 / Принята к печати: 13 апреля 2015. © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Задачей исследования является оценка защитного воздействия лекарственного средства на основе растительного сырья (Тутукон) на индуцированные гипероксалурией апоптотические изменения и отложения кристаллов солей в эпителии почечных канальцев крыс. Шестидесят самцов крыс линии Вистар были разделены на три группы (по n=20). У животных из группы I тяжелая гипероксалурия была индуцирована введением этиленгликоля (ЭГ) (0,75%) на протяжении 28 дней. Животные группы II, помимо индукции гипероксалурии, получали также Тутукон на протяжении 28 дней. Животные группы III использовались в качестве контрольных и не получали лекарственных средства.

Наличие и степень тяжести отложения кристаллов солей в просвете канальцев определяли методом гистологического анализа под световым микроскопом, апоптотические изменения клеток почечных канальцев определяли методом иммуногистохимического окрашивания для выявления аспартат-специфичной цистеиновой протеазы (Каспаза-3) и фактора некроза опухоли альфа (ФНО-альфа) на 14-й и 28-й дни соответственно. Оценка апоптотических изменений путем выявления Каспазы-3 свидетельствует о том, что, хотя у большинства животных, получавших только ЭГ, выявлены явные апоптотические изменения (n=9), у животных, получавших Тутукон, продемонстрированы достоверно меньшие нарушения, при менее выраженном апоптозе или его отсутствии (n=7). Аналогичные показатели получены и по результатам определения экспрессии ФНО-альфа; апоптотические изменения выявлены у 8 (80%) животных из группы I, а у животных из группы получения препарата Тутукон выявлены лишь ограниченные изменения (n=2). Определение содержания кристаллов солей показало, что вопреки явным изменениям у животных из группы I (n=9), а именно – апоптотическим изменениям, оно было достоверно меньшим у животных, получавших Тутукон (n=4). Отложение кристаллов солей и апоптотические изменения, индуцированные гипероксалурией, играют важную роль в патогенезе мочекаменной болезни, и применение препарата Тутукон может обеспечивать снижение таких изменений благодаря антиоксидантному и противовоспалительному действию препарата.

**Ключевые слова:** лекарственное средство на основе растительного сырья, апоптотические изменения, отложения солей кристаллов, антиоксидантное действие.

Гипероксалурия – основной риск образования идиопатических кальций-оксалатных (C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) камней у человека. Гипероксалурия – мощный толчок к образованию камней и

развитию C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> уролитиаза [1]. Результаты как клинических, так и экспериментальных исследований позволяют предположить, что эпителий почечных канальцев является основной мишенью, индуцированное оксалатами повреждение и стойкая гипероксалурия в сочетании со взаимодействием кристаллы солей–клетки, может привести к повреждению клеток почечных канальцев [2, 3]. По данным недавно проведенных исследований LLC-PK1 клеток было убедительно продемонстрировано, что высокая концентрация оксалатов в сочетании с образованием/отложением C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> кристаллов может вызывать повреждение клеток почечных канальцев и/или нарушение их функций, ряд морфологических изменений и нарушений функций клеток почечных канальцев, включая нарушение пролиферации клеток, что при высокой концентрации может привести к клеточному апоптозу [4–6].

Этиопатогенез клеточного повреждения при получении вещества, вызывающего гипероксалурию, основан на перекисном окислении липидов в клетках канальцев, что ведет к функциональному повреждению клеточных компонентов вследствие образования реактивных форм кислорода (РФК), обусловленного оксидативным стрессом [4, 7, 8]. Помимо возможной ишемии канальцев, вызванной гипероксалурией, обуславливающей повышение выработки реактивных форм кислорода (РФК) в результате перекисного окисления липидов, в проведенных исследованиях было убедительно продемонстрировано, что и сами ионы оксалатов могут вызывать изменения в канальцах вследствие непосредственного токсического воздействия [4, 5, 9, 10].

Принимая во внимание вредное действие гипероксалурии, вызывающей отложение кристаллов в паренхимальных тканях почек и апоптотические изменения эпителия почечных канальцев (вследствие выработки РФК), перспективность применения защитных средств для предотвращения или, по меньшей мере, уменьшения объема патологических изменений, не вызывает сомнений. Известно, что верапамил и нифедипин (вещества, блокирующие кальциевые каналы) снижают уровень гистологических изменений, а также отложение кристаллов солей, вызванное определенными повреждениями почек [8, 11, 12]. Установлено, что цитрат кальция снижает частоту случаев образования почечных камней после экстракорпоральной ударно-волновой литотрипсии [7], а аллопуринол и витамин Е применяют в качестве антиоксидантов для минимизации воздействия свободных радикалов кислорода, образующихся в некоторых тканях [11, 13, 14].

Данные недавно проведенных исследований убедительно демонстрируют, что перспективной и эффективной альтернативой

тивной применению указанных лекарственных средств являются лекарственные средства на основе растительного сырья, все шире используемые для профилактики и метафилактики образования почечных камней [22, 23], а также для улучшения результатов литотрипсии [24]. Одним из таких препаратов является Тутукон – средство на основе многочисленных растительных ингредиентов, обладающих определенными биологическими свойствами. Наиболее важной характеристикой этих ингредиентов является антиоксидантное действие.

**Целью исследования**, проведенного нами на животных с учетом эффективного антиоксидантного действия, была оценка возможного защитного действия препарата Тутукон на развитие и степень апоптических изменений, а также отложение кристаллов солей в эпителиальных клетках почечных канальцев, индуцированных веществом, вызывающим гипероксалурию у крыс.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования было отобрано 60 самцов крыс линии Вистар, каждое животное имело массу тела 250–300 г. Было получено одобрение этического комитета лаборатории животных Ветеринарного научно-исследовательского института Пендик. Все животные получали стандартный корм, содержались в стандартных условиях, были тщательно обследованы, в том числе были проведены биохимические анализы, анализы крови, мочи и кала.

Животные были разделены на три группы ( $n=20$ ). Животные из группы I получали рацион, дополненный веществом, индуцирующим гипероксалурию, 0,75% этилен гликоль (ЭГ) в дистиллированной воде для питья с 1-го по 28-й дни, а крысы из группы II получали в дополнение к веществу, вызывающего гипероксалурию, защищающий препарат Тутукон через катетер (по 5 мл/массы тела – 3 раза в день по 20 мл с разделением на несколько введений в день) на протяжении 28 дней экспериментальной стадии исследования. И наконец, в группу III были включены контрольные животные, получавшие чистую дистиллированную воду на всех этапах исследования.

В период экспериментальной стадии исследования все животные получали стандартный корм без ограничений. После 2 нед получения вещества, вызывающего гипероксалурию, животными I группы, дополнительного защитного вещества животными II группы и стандартного рациона животными III группы, на 14-й день по десять животных из каждой группы умерщвляли. Через двусторонние боковые разрезы извлекали почки для последующего гистологического исследования. Такую же процедуру проводили через 28 дней.

### Характеристики лекарственного средства

Фармакологическая группа: фиксированная комбинация растительных веществ.

Рекомендованная доза: по 45 мл 3 раза в день.

Активные растительные ингредиенты: эфирные масла, флавоноиды – кверцитин, полисахариды, розмариновая кислота, болдин, флавоновые гликозиды.

### Гистологическое исследование

Почки погружали в 10% раствор формалина для фиксации, заливали парафином для получения блоков, пригодных для резки, микротомировали на срезы толщиной 4–6 мкм, срезы окрашивали гематоксилином – эозином (Г и Э), Шифф-йодной кислотой (реактив Шиффа) (Bio-Optica, Милан) и трихромом по Массону (МТК) (Bio-Optica, Милан). При проведении иммуногистохимических исследований для визуализации применяли систему Bond polymer refine detection (Leica Biosystems Newcastle Ltd., Ньюкасл) с диаминобензидином в качестве хромогена, и гематоксилином для контрастного окрашивания ядер. Все иммуногистохимические исследования

проведены с использованием автоматической системы Leica BOND-MAX (Leica Biosystems, Мельбурн). Были использованы следующие антитела: антитела к ФНО-альфа (поликлональные, в разведении 1:500; Novus Biologicals, Великобритания), антитела к Каспазе-3 (клон JHM62 в разведении 1:400; Leica Biosystems Newcastle Ltd., Ньюкасл). Для разведения всех антител применяли растворитель Lab Vision™ Antibody Diluent (TA-125-AD, Thermo Scientific™, Калифорния).

Результаты окрашивания для выявления каспазы и ФНО-альфа, оценивали по трехбальной шкале:

- оценка 0 – не выявлены;
- оценка 1 – слабая иммунная реакция или одиночные позитивные клетки;
- оценка 2 – рассеянная умеренно интенсивная иммунная реакция или многочисленные позитивные клетки;
- оценка 3 – сплошная зона иммунной реакции либо скопления позитивных клеток.

Систему оценки применяли и для классификации канальцев, при исследовании для выявления гранул кристаллов и/или кальцификации методом световой микроскопии с поляризованным фильтром; срезы окрашивали эозином, исследование проводили двойным слепым методом. Степень кристаллизации оценивали следующим образом:

- оценка 0 – отсутствует;
- оценка 1 – минимальная: одиночные кристаллы на одном участке;
- оценка 2 – умеренная: рассеянные кристаллы не более чем на одном участке;
- оценка 3 – тяжелая: плотные скопления кристаллов, многочисленные скопления.

### Статистический анализ

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программного обеспечения NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 и PASS (Power Analysis and Sample Size) 2008 (Юта, США). При оценке полученных данных, в дополнение к определенным статистическим методам (определение среднего значения, стандартного отклонения, медианного значения, частоты, соотношения) применяли U-критерий Манна–Уитни для оценки параметров, характеризующих аномальные распределения при сравнении данных трех групп. Тем не менее, если количество групп данных, для которых продемонстрировано аномальное распределение, превышало 3, применяли критерий Крускала–Уоллиса. И наконец, U-критерий Манна–Уитни применяли для идентификации групп данных, вызывающих различие между группами. Данные классифицировали, как статистически достоверные при уровнях  $p<0,01$  и  $p<0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В целом, за период исследования погибло четыре животных, причиной гибели двух животных была инфекция и еще двух – отказ от корма. Оценены апоптические изменения клеток почечных канальцев, о чем говорит наличие ФНО-альфы и Каспазы-3, выявленное методом иммуногистохимического окрашивания, а также отложение кристаллов солей в паренхимальных тканях почек, через 14 и 28 дней были получены определенные данные.

### Оценка апоптических изменений клеток почечных канальцев

Установлено, что апоптические изменения были более выражены в клетках почечных канальцев, окруженных кристаллами солей. Тем не менее, апоптические изменения определенной степени наблюдались также и в клетках почечных канальцев, не окруженных кристаллами солей. С другой стороны, вы-

**Оценка количества клеток с положительной реакцией на окрашивание для выявления ФНО-альфа у животных всех групп на раннем и позднем этапах оценивания**

| Оценка  | Контроль           |      | Этилен гликоль     |      | Этилен гликоль + Тутукоп |      | p        |
|---|--------------------|------|--------------------|------|--------------------------|------|----------|
|   | Абс. число         | %    | Абс. число         | %    | Абс. число               | %    |          |
| Ранний этап (14-й день)                             |                    |      |                    |      |                          |      |          |
| 0   | 4                  | 40   | 0                  | 0    | 2                        | 20   |          |
| 1   | 5                  | 50   | 2                  | 20   | 6                        | 60   |          |
| 2   | 1                  | 10   | 5                  | 50   | 2                        | 20   |          |
| 3   | 0                  | 0    | 3                  | 30   | 0                        | 0    |          |
| Общая   | 10                 | 100  | 10                 | 100  | 10                       | 100  |          |
| Среднее ± СО (медианная оценка)                     | 0,70±0,67 (1)      |      | 2,10±0,74 (2)      |      | 1,00±0,67(1)             |      | 0,002а** |
| Поздний этап (28-й день)                            |                    |      |                    |      |                          |      |          |
| 0   | 1                  | 11,1 | 0                  | 0    | 0                        | 0    |          |
| 1   | 7                  | 77,8 | 1                  | 12,5 | 5                        | 55,6 |          |
| 2   | 1                  | 11,1 | 4                  | 50   | 3                        | 33,3 |          |
| 3   | 0                  | 0    | 3                  | 37,5 | 1                        | 11,1 |          |
| Общая   | 9                  | 100  | 8                  | 100  | 9                        | 100  |          |
| Среднее ± СО (медианная оценка)                     | 1,00±0,50 (1)      |      | 2,25±0,71 (2)      |      | 1,56±0,73 (1)            |      | 0,014а*  |
| Медианное значение оценки на раннем и позднем этапе |                    |      |                    |      |                          |      |          |
| P   | 0,252 <sup>б</sup> |      | 0,662 <sup>б</sup> |      | 0,118 <sup>б</sup>       |      |          |

*Примечание.* Результаты окрашивания для выявления ФНО-альфа оценивали по трехбалльной шкале: не выявлены – оценка 0; слабая иммунная реакция или одиночные позитивные клетки – оценка 1; рассеянная умеренно интенсивная иммунная реакция или многочисленные позитивные клетки – оценка 2; сплошная зона иммунной реакции, либо скопления позитивных клеток – оценка 3.

ФНО-альфа – Фактор некроза опухоли альфа; \* Статистически достоверная разница; \*\* Статистическая разница высоко достоверная; p<0,05, \*\* p<0,01; <sup>а</sup> Критерий Крускала – Уоллиса; <sup>б</sup> U-критерий Манна-Уитни

явлены выраженные апоптотические изменения в дистальных отделах канальцев, а также в собирающих протоках. Оценка апоптотических изменений в клетках почечных канальцев по положительному результату выявления Каспазы-3 на первом этапе оценки (через 14 дней) свидетельствует о том, что хотя количество животных с умеренными и тяжелыми апоптотическими изменениями в контрольной группе было достоверно меньшим, у большого количества животных, получавших только ЭГ, отмечены умеренные или тяжелые апоптотические изменения (n=9, 90%) (рис. 1). Одновременное получение Тутукопа обеспечило несомненное уменьшение количества животных с апоптотическими изменениями (n=7, 70%), уровень тяжести апоптотических изменений у большинства животных также был меньшим (рис. 2). Среднее количество апоптотических клеток, давших положительную реакцию на окрашивание для выявления Каспазы-3, на этом этапе составляло 2,25±0,71 и 1,22±0,83 (p=0,021) в этих двух группах соответственно (табл. 1).

Таким образом, полученные нами результаты продемонстрировали, что введение препарата Тутукоп предотвращает или, как минимум, снижает уровень апоптотических изменений эпителиальных клеток почечных канальцев, как на раннем (день 14), так и позднем этапе (день 28). Тем не менее, хотя различие, установленное по результатам анализа данных, полученных на позднем этапе было достоверным (p=0,021), различие данных, полученных на раннем этапе, не достигло уровня статистической достоверности (p=0,079).

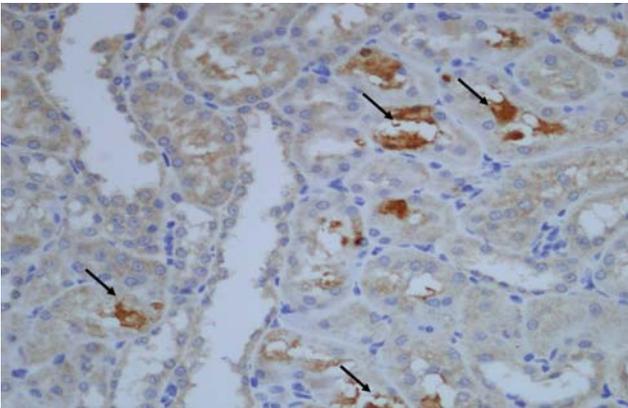
С другой стороны, экспрессия ФНО-альфа после инфекции гипероксалурии у животных исследуемой группы свидетельствует о несомненных апоптотических изменениях уже на раннем этапе (через 14 дней), умеренные и тяжелые апоптотические изменения выявлены у 8 (80%) животных (рис. 3). Эти

изменения, как было установлено, были выявлены у значительно меньшего количества животных из контрольной группы (n=1, 10%) и животных, получавших Тутукоп (n=2, 20%) (рис. 4). Средние оценки апоптотических клеток, давших положительную реакцию при окрашивании для выявления ФНО-альфа, у животных группы I (2,10±0,74) были достоверно большими по сравнению с оценками в группе II (1,00±0,67) (p=0,005) при оценке, проведенной через 14 дней. Такие же результаты были получены и по результатам анализа данных, полученных на позднем этапе (через 28 дней) (табл. 2).

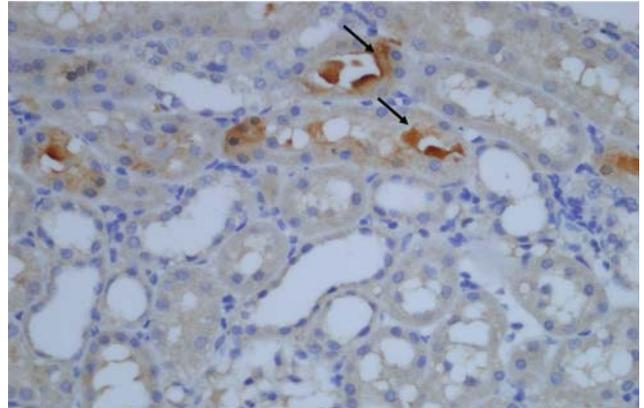
#### Оценка отложения кристаллов солей

Оценка образцов паренхимальных тканей почек крыс, получавших вещество, индуцирующее гипероксалурию на протяжении 14 дней, свидетельствует об отложении кристаллов солей различной степени, главным образом, в просвете канальцев. В интерстициальных тканях выявлено незначительное отложение кристаллов солей, но не гистологические изменения. У животных этой группы обширное отложение кристаллов солей выявлено как на раннем, так и позднем этапах определения (рис. 5). На раннем этапе (14 дней) значительное отложение отмечено у 3 (30%) животных, а умеренное и минимальное – у 6 (60%) и 1 (10%) животных соответственно. Средняя общая оценка отложения для этой группы составила 2,20±0,63.

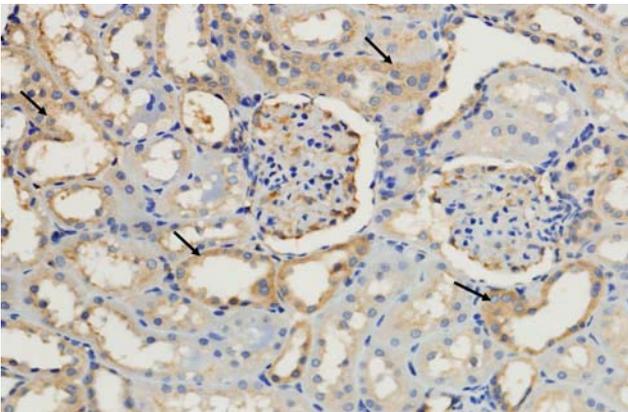
Исследование почек животных, получавших Тутукоп в период индукции гипероксалурии, свидетельствует о защитном действии этого лекарственного средства на наличие и степень тяжести отложения кристаллов солей. Значительное отложение отмечено у 1 (10%) животного, а умеренное и минимальное – у 3 (30%) и 6 (60%) животных соответственно (рис. 6). Средняя общая оценка отложения у животных этой группы по срав-



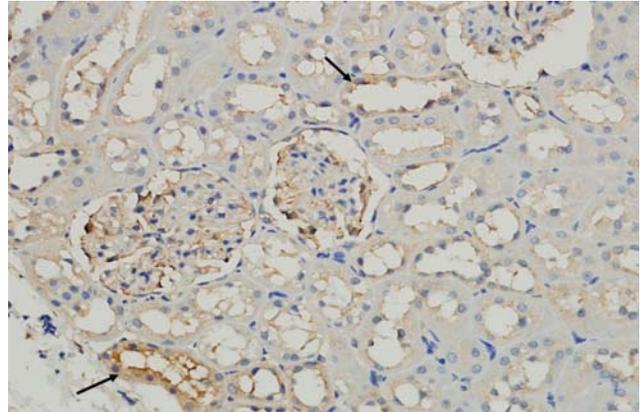
**Рис. 1.** Свидетельство экспрессии Каспазы-3, иммуногистохимическое окрашивание образцов тканей животных после индукции гиперкалемии без защищающего почки препарата (Каспаза-3, оригинальное увеличение  $\times 400$ )



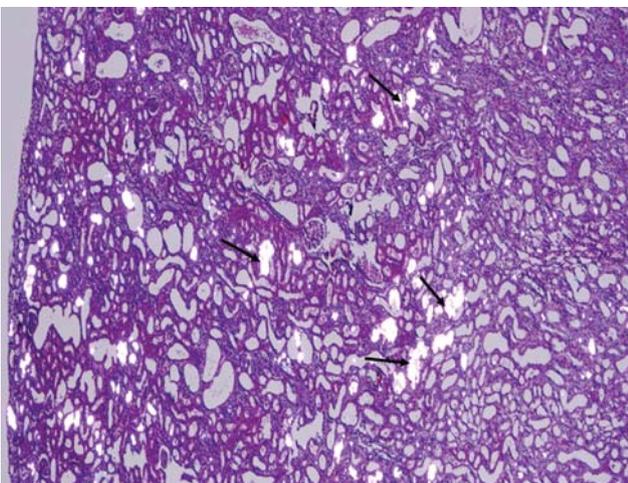
**Рис. 2.** Минимальная экспрессия Каспазы-3, иммуногистохимическое окрашивание образцов тканей животных после индукции гиперкалемии и введения препарата Тутукон (Каспаза-3, оригинальное увеличение  $\times 400$ )



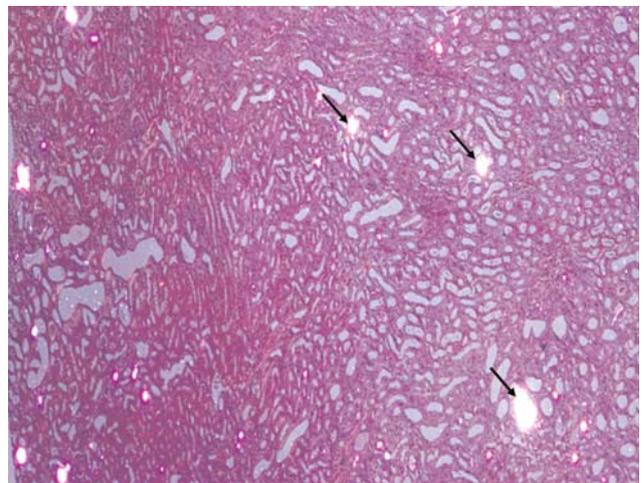
**Рис. 3.** Свидетельство экспрессии ФНО-альфа, иммуногистохимическое окрашивание образцов тканей животных после индукции гиперкалемии без защищающего почки препарата (ФНО-альфа, оригинальное увеличение  $\times 400$ )



**Рис. 4.** Минимальная экспрессия ФНО-альфа, иммуногистохимическое окрашивание образцов тканей животных после индукции гиперкалемии и введения препарата Тутукон (ФНО-альфа, оригинальное увеличение  $\times 400$ )



**Рис. 5.** Свидетельство отложения кристаллов (многочисленные области плотных скоплений) у животных после индукции гиперкалемии без защищающего почки препарата (окрашивание Г и Э, поляризованный фильтр Olympus, оригинальное увеличение  $\times 400$ )



**Рис. 6.** Ограниченное отложение кристаллов у животных после индукции гиперкалемии при получении препарата Тутукон (окрашивание Г и Э, поляризованный фильтр Olympus, оригинальное увеличение  $\times 400$ )

## УРОЛОГИЯ

Таблица 2

### Оценка экспрессии Каспазы-3 в клетках почечных канальцев у животных всех групп на раннем и позднем этапах оценки

| Оценка  | Контроль           |      | Этилен гликоль     |      | Этилен гликоль + Тутукон |      | P                    |
|---|--------------------|------|--------------------|------|--------------------------|------|----------------------|
|   | Абс. число         | %    | Абс. число         | %    | Абс. число               | %    |                      |
| Ранний этап (14-й день)                             |                    |      |                    |      |                          |      |                      |
| 0   | 5                  | 50   | 0                  | 0    | 3                        | 30   |                      |
| 1   | 5                  | 50   | 1                  | 10   | 0                        | 0    |                      |
| 2   | 0                  | 0    | 5                  | 50   | 6                        | 60   |                      |
| 3   | 0                  | 0    | 4                  | 40   | 1                        | 10   |                      |
| Общая   | 10                 | 100  | 10                 | 100  | 10                       | 100  |                      |
| Среднее ± СО (медианная оценка)                     | 0,50±0,53 (0,5)    |      | 2,30±0,67 (2)      |      | 1,50±1,08 (2)            |      | 0,001 <sup>***</sup> |
| Поздний этап (28-й день)                            |                    |      |                    |      |                          |      |                      |
| 0   | 3                  | 33,3 | 0                  | 0    | 2                        | 22,2 |                      |
| 1   | 6                  | 66,7 | 1                  | 12,5 | 3                        | 33,3 |                      |
| 2   | 0                  | 0    | 4                  | 50   | 4                        | 44,4 |                      |
| 3   | 0                  | 0    | 3                  | 37,5 | 0                        | 0    |                      |
| Общая   | 9                  | 100  | 8                  | 100  | 9                        | 100  |                      |
| Среднее ± СО (медианная оценка)                     | 0,67±0,50 (1)      |      | 2,25±0,71 (2)      |      | 1,22±0,83 (1)            |      | 0,007 <sup>a*</sup>  |
| Медианное значение оценки на раннем и позднем этапе |                    |      |                    |      |                          |      |                      |
| P   | 0,475 <sup>б</sup> |      | 0,883 <sup>б</sup> |      | 0,421 <sup>б</sup>       |      |                      |

*Примечание.* Результаты окрашивания для выявления Каспазы оценивали по трехбалльной шкале: не выявлены – оценка 0; слабая иммунная реакция или одиночные позитивные клетки – оценка 1; рассеянная умеренно интенсивная иммунная реакция или многочисленные позитивные клетки – оценка 2; сплошная зона иммунной реакции, либо скопления позитивных клеток – оценка 3.

<sup>\*\*</sup> Статистическая разница высоко достоверная; <sup>\*\*</sup> p<0,01; <sup>а</sup> Критерий Крускала–Уоллиса; <sup>б</sup> U-критерий Манна–Уитни

Таблица 3

### Оценка отложения кристаллов солей у животных всех групп

| Оценка  | Контроль           |     | Этилен гликоль       |     | Этилен гликоль + Тутукон |      | P                    |
|---|--------------------|-----|----------------------|-----|--------------------------|------|----------------------|
|   | Абс. число         | %   | Абс. число           | %   | Абс. число               | %    |                      |
| Ранний этап (14-й день)                             |                    |     |                      |     |                          |      |                      |
| 0   | 9                  | 90  | 0                    | 0   | 0                        | 0    |                      |
| 1   | 1                  | 10  | 1                    | 10  | 6                        | 60   |                      |
| 2   | 0                  | 0   | 6                    | 60  | 3                        | 30   |                      |
| 3   | 0                  | 0   | 3                    | 30  | 1                        | 10   |                      |
| Общая   | 10                 | 100 | 10                   | 100 | 10                       | 100  |                      |
| Среднее ± СО (медианная оценка)                     | 0,10±0,32 (0)      |     | 2,20±0,63 (2)        |     | 1,50±0,71 (1)            |      | 0,001 <sup>a**</sup> |
| Поздний этап (28-й день)                            |                    |     |                      |     |                          |      |                      |
| 0   | 9                  | 100 | 0                    | 0   | 0                        | 0    |                      |
| 1   | 0                  | 0   | 0                    | 0   | 3                        | 33,3 |                      |
| 2   | 0                  | 0   | 0                    | 0   | 5                        | 55,6 |                      |
| 3   | 0                  | 0   | 8                    | 100 | 1                        | 11,1 |                      |
| Общая   | 9                  | 100 | 8                    | 100 | 9                        | 100  |                      |
| Среднее ± СО (медианная оценка)                     | 0,00±0,00 (0)      |     | 3,00±0,00 (3)        |     | 1,78±0,67 (2)            |      | 0,001 <sup>a**</sup> |
| Медианное значение оценки на раннем и позднем этапе |                    |     |                      |     |                          |      |                      |
| P   | 0,343 <sup>б</sup> |     | 0,0046 <sup>**</sup> |     | 0,321 <sup>б</sup>       |      |                      |

*Примечание.* Степень отложения кристаллов оценивали следующим образом: отсутствует - оценка 0; минимальная: одиночные кристаллы на одном участке - оценка 1; умеренная: рассеянные кристаллы не более чем на одном участке - оценка 2; тяжелая: плотные скопления кристаллов, многочисленные скопления - оценка 3. <sup>\*\*</sup> Статистическая разница высоко достоверная; <sup>\*\*</sup> p<0,01; <sup>а</sup> Критерий Крускала–Уоллиса; <sup>б</sup> U-критерий Манна–Уитни

нению с животными, получавшими только ЭГ, была достоверно меньшей и составила лишь  $1,50 \pm 0,71$  ( $p=0,031$ ). И последний, но немаловажный факт, как и ожидалось, отложение кристаллов солей не было выявлено у животных контрольной группы (средняя общая оценка отложения кристаллов составила  $0,10 \pm 0,32$ ) (табл. 3). Такие же результаты были получены и на позднем этапе определения (28 дней), что свидетельствует о снижении уровня отложения кристаллов солей при получении животными препарата Тутукон на этапе индукции гипероксалурии ( $p=0,001$ ). Информации об уровне отложения кристаллов солей у животных всех групп приведена в табл. 3.

Данными экспериментальных исследований было убедительно продемонстрировано, что кристаллы  $C_2O_4$  и/или ионы оксалата, образующиеся при получении веществ, индуцирующих гипероксалурию, играют решающую роль в развитии мочекаменной болезни. Установлено, что индукция гипероксалурии ассоциируется с повреждением клеток и некрозом эпителиальных клеток почечных канальцев [1, 3, 15]. Энзимурия, протеинурия и содержание в моче продуктов дестабилизации клеточных мембран после получения животными веществ, вызывающих гипероксалурию, также подтверждает достоверность этой гипотезы [2]. Повреждение канальцев даже при отсутствии кристаллурии позволяет предположить, что повреждение вызывается не только кристаллами  $C_2O_4$ , токсическое воздействие на клетки почечных канальцев может быть обусловлено также ионами оксалатов [16].

Что касается механизма повреждения клеток почечных канальцев, помимо оригинального исследования, проведенного Khan и соавторами [15], другими группами исследователей было продемонстрировано, что функциональное повреждение клеточных компонентов обусловлено оксидативным стрессом, вызывающим образование ОФК [4, 7, 8]. Как было продемонстрировано Scheid и соавторами [6], из разнообразных моно- и дикарбоксилатов, рассмотренных в их исследовании, наиболее частым причинным фактором усиленной выработки свободных радикалов и последующей гибели клеток является высокое содержание оксалатов.

Результаты надлежащим образом организованных и проведенных исследований на животных позволили авторам предположить, что вследствие воздействия ионов оксалатов на эпителиальные клетки почек запускается каскад событий, ведущих к клеточной пролиферации или клеточной гибели [4, 5, 9, 10]. И последний, но немаловажный факт: Koul и соавторам [4] удалось продемонстрировать возможность наличия причинной связи между индуцированным оксалатами увеличением экспрессии гена *C-myc* и индуцированным оксалатами усилением клеточной пролиферации. Все эти данные свидетельствуют о том, что апоптоз, как одна из форм клеточной гибели, может вызывать также и повреждение почечных канальцев, индуцированное гипероксалурией. Для подтверждения этого предположения нами были продемонстрированы апоптотические изменения клеток почечных канальцев кроликов, показано, что степень и объем таких изменений увеличивается со временем [17]. После подтверждения вредного воздействия гипероксалурии, следствием которой является отложение кристаллов солей и апоптотические изменения эпителиальных клеток почечных канальцев, врачи начали поиск средств, предотвращающих или хотя бы уменьшающих уровень таких патологических изменений [18].

Из средств, применявшихся до сих пор, верапамил и нифедипин (вещества, блокирующие кальциевые каналы) несколько снижают уровень гистологических изменений, а также отложение кристаллов солей [12, 19, 20]. Цитрат кальция снижает частоту случаев образования почечных камней после экстракорпоральной ударно-волновой литотрипсии [7], а аллопуринол и витамин Е, сильнодействующие антиоксиданты, применяются для минимизации воздействия свобод-

ных радикалов кислорода, образующихся в некоторых тканях, за счет подавления образования РФК [11, 13, 14, 21].

Данные недавно проведенных исследований убедительно продемонстрировали, что перспективной и эффективной альтернативой применению указанных лекарственных средств являются лекарственные средства на основе растительного сырья, все шире используемые для профилактики и метафилактики почечных камней [22, 23]. Установлено, что дополнительное применение фитотерапевтических средств в курсе консервативного лечения мочекаменной болезни улучшает результаты литотрипсии и повышает эффективность метафилактики образования камней в мочевыводящих путях [24]. Оценка данных, приведенных в литературных источниках, свидетельствует о том, что большинство фитотерапевтических средств оказывает мочегонное, противовоспалительное, антиоксидантное, сосудорасширяющее и спазмолитическое действия [25, 26].

Действующие ингредиенты, ответственные за эти специфические эффекты, выявлены в эфирных маслах, флавоноидах, сапонилах, производных ксантина и гликозидах [25, 27–29]. Из фитотерапевтических средств, применяемых до настоящего времени, наиболее перспективным для предотвращения образования камней представляется использование *Phyllanthus niruri* (Филантус нирури) [25, 30] вследствие содержания потенциально активных соединений вида *Phyllanthus*, алкалоидов, флавоноидов, лактонов, стероидов, терпеноидов, лигнанов и танинов.

Помимо убедительно продемонстрированных спазмолитического [26] и обезболивающего [25] действий, было доказано, что это растительное средство ингибирует эндотокс  $C_2O_4$  клетками почечных канальцев. Гипотеза была подтверждена также в клиническом исследовании, проведенном с включением небольшого количества пациентов, в котором было показано, что при получении этого средства снижается уровень выведения кальция с мочой у пациентов с камнями вследствие гиперкальциемии [31]. Другими растительными средствами, применяемыми для снижения уровня отложения кристаллов солей и последующего образования камней, являются марокканское растение *Hernaria hirsuta* (грыжник волосатый) и *зеленый чай*. Их использование для ограничения формирования  $C_2O_4$  представляется перспективным [22, 30].

Учитывая информацию о действии антиоксидантов и противовоспалительных средств, предотвращающих повреждение эпителиальных клеток почечных канальцев, вызванное ишемией, мы поставили задачей своего исследования оценку возможного снижения апоптотических изменений клеток почечных канальцев и последующее отложение кристаллических солей вследствие гипероксалурии при применении сильнодействующего антиоксидантного и противовоспалительного средства на основе растительного сырья (Тутукон). Для определения нами использована модель повреждения почек крыс.

Тутукон (Grand Medical, Испания) является лекарственным средством на основе различных растительных ингредиентов, оказывающим определенные биологические эффекты на различные ткани (рис. 1). Одной из наиболее важных характеристик этого препарата является антиоксидантное действие, обусловленное действующими веществами в его составе. Опубликованные данные свидетельствуют о том, что из 8 ингредиентов в составе этого препарата: алкалоиды, розмариновая кислота, флавоноиды [27], апигенин, лютеолин [28], сапонин эквизетонин [29] и эфирные масла [32] обладают выраженными антиоксидантными и противовоспалительными свойствами. Что касается механизма действия, данными исследований было убедительно продемонстрировано, что указанные выше действующие ингредиенты обеспечивают снижение проницаемости капилляров почек, спо-

собствуют расширению кровеносных сосудов почек и мочеточников, восстанавливают эпителиальные функции канальцев, активируют осмотический эффект, ингибируют синтез и активацию медиаторов воспаления и предотвращают воспалительные изменения, а также отложение кристаллов солей и их рост [22, 24–26, 33].

Полученные нами данные убедительно демонстрируют достоверное формирование/отложение кристаллов солей, а также апоптоз клеток почечных канальцев у животных после индукции гипероксалурии введением ЭГ уже на раннем этапе гипероксалурии (день 14). Количественное определение клеточного апоптоза и отложения кристаллов солей свидетельствует о достоверном различии между этими животными и животными, получавшими также и защитное средство (Тутукон). Как уже упоминалось ранее, индуцированный ишемией оксидативный стресс почечных канальцев и воспалительные изменения являются основной причиной апоптоза клеток почечных канальцев, а также последующего формирования/отложения кристаллов солей.

Полученные нами результаты продемонстрировали, что Тутукон, благодаря содержанию сильнодействующих ингредиентов – алкалоидов, розмариновой кислоты, флавоноидов [27], апигенина, лютеолина [28], сапонина эквизетонина [29] и эфирных масел [32] – оказывает достаточное защитное действие, снижая уровень изменений, вызывающих образование кристаллов, по меньшей мере, у животных в использованной нами экспериментальной модели. Введение животным препарата Тутукон обеспечивает достоверную защиту

от отложения оксалата кальция и апоптоза клеток почечных канальцев. Тем не менее, не вызывает сомнений, что доза расщепляющего средства, вводившаяся крысам в ходе нашего исследования, не соответствует клинической дозе, рекомендованной в терапевтической практике.

## ВЫВОДЫ

Данные, полученные нами, а также приведенные в литературных источниках, свидетельствуют о том, что и гипероксалурия, и образование кристаллов  $C_2O_4$  повреждают эпителиальные клетки почек. Основной причиной таких изменений является апоптоз клеток почечных канальцев, вследствие образования свободных радикалов, вызывающего перекисное окисление липидов. В проведенном нами исследовании установлено, что сильнодействующее антиоксидантное лекарственное средство Тутукон снижает уровень осаждения кристаллов и апоптотических изменений. Это позволяет предположить, что клиническое применение подобных антиоксидантных и противовоспалительных препаратов может ограничивать образование почечных камней, в особенности предотвращать рецидивы их образования. Мы считаем, что необходимо проведение дальнейших клинических и экспериментальных исследований для подтверждения описанного выше профилактического действия этого препарата, предупреждающего образование кристаллов  $C_2O_4$ .

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Зниження рівня апоптозу і відкладення солей при використанні Тутукону в умовах пошкодження тубулярних клітин нирок у разі гіпероксалурії на моделі з використанням шурів *Cahit Sahin, Sukran Sarikaya, Kayhan Basak, Cihangir Ali Cetinel, Fehmi Narter, Bilal Eryildirim, Erkin Saglam, Kemal Sarica*

Завданням дослідження є оцінювання наслідків протекційного характеру лікарського засобу на основі рослинної сировини (Тутукон) на індукованій гіпероксалуриєю апоптотичні зміни і відкладення кристалів солей в епітелії ниркових канальців шурів. Шістьдесят самців шурів лінії Вістар були розділені на три групи (по  $n=20$ ). У тварин з групи I важка гіпероксалурія була індукована введенням етиленгліколю (EG) (0,75%) протягом 28 днів. Тварини групи II, окрім індукції гіпероксалурії, отримували також Тутукон протягом 28 днів. Тварини групи III використовувалися в якості контрольних і не отримували лікарських засобів. Наявність і ступінь тяжкості відкладення кристалів солей у просвіті канальців визначали методом гістологічного аналізу під світловим мікроскопом, апоптотичні зміни клітин ниркових канальців визначали методом імуногістохімічного фарбування для виявлення аспарат-специфічної цистеїнової протеази (Каспаза-3) і фактора некрозу пухлини альфа (ФНП-альфа) на 14-й і 28-й дні відповідно. Оцінювання апоптотичних змін шляхом виявлення Каспази-3 свідчить про те, що, хоча у більшості тварин, які отримували тільки EG, виявлено явні апоптотичні зміни ( $n=9$ ), у тварин, які отримували Тутукон, продемонстровані достовірно менші порушення, при менш вираженому апоптозу або його відсутності ( $n=7$ ). Аналогічні показники отримані і за результатами визначення експресії ФНП-альфа; апоптотичні зміни виявлені у 8 (80%) тварин з групи I, а в тварин з групи отримання препарату Тутукон виявлені лише незначні зміни ( $n=2$ ). Визначення змісту кристалів солей показало, що всупереч явним змінам у тварин з групи I ( $n=9$ ), а саме – апоптотичним змінам, воно було достовірно меншим у тварин, які отримували Тутукон ( $n=4$ ). Відкладення кристалів солей і апоптотичні зміни, індуковані гіпероксалуриєю, відіграють важливу роль у патогенезі сечокам'яної хвороби, і застосування препарату Тутукон може забезпечувати зниження таких змін завдяки антиоксидантній та протизапальній дії препарату.

**Ключові слова:** лікарський засіб на основі рослинної сировини, апоптотичні зміни, відкладення солей кристалів, антиоксидантна дія.

### Limitation of apoptotic changes and crystal deposition by Tutukon following hyperoxaluria induced tubular cell injury in rat model

*Cahit Sahin, Sukran Sarikaya, Kayhan Basak, Cihangir Ali Cetinel, Fehmi Narter, Bilal Eryildirim, Erkin Saglam, Kemal Sarica*

This study aimed at evaluating the protective effects of a herbal medication (Tutukon) on the hyperoxaluria induced apoptotic changes and crystal deposition in renal tubular epithelium in rat model. 60 male wistar rats were divided into three different groups (each group  $n: 20$ ). In Group I severe hyperoxaluria was induced by ethylene glycol (EG) (0.75 %) administration for 28 days. In Group II, in addition to hyperoxaluria induction, animals were treated with Tutukon for 28 days. Group III animals constituted the controls without any specific medication and/or intervention. While the presence and degree of crystal deposition in the tubular lumen were examined histopathologically under light microscopy, tubular apoptotic changes were evaluated using immunohistochemical staining for cysteine-aspartic acid protease-3 (Caspase-3) and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) positivity on days 14 and 28, respectively. Evaluation of apoptotic changes by Caspase-3 positivity showed that while the majority of animals undergoing EG only showed evident apoptotic changes ( $n: 9$ ), Tutukon application demonstrated a significant limitation with limited or no apoptosis ( $n: 7$ ) in these animals. Similar data were noted for TNF alpha expression; while apoptotic changes were evident in 8 (80 %) in Group I animals, limited changes were noted in Tutukon Group ( $n: 2$ ). Regarding crystal deposition despite evident changes in Group I (9 animals), like apoptotic alterations, it was again significantly limited in animals receiving Tutukon (4 animals). Renal tubular crystal deposition and apoptotic changes induced by hyperoxaluria play a role in the pathogenesis of urolithiasis and the limitation of these changes might be instituted by Tutukon as a result of its antioxidant and anti-inflammatory effects.

**Key words:** Herbal medication, Apoptotic, Changes, Crystal deposition, Antioxidant effects.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hackett RL, Shevock PN, Khan SR (1990) Cell injury associated with calcium oxalate crystalluria. *J Urol* 144:1535.
2. Khan SR, Shevock PN, Hackett RL (1989) Urinary enzymes and calcium oxalate urolithiasis. *J Urol* 142:846.
3. Lieske JC, Norris R, Swift H, Toback FG (1997) Adhesion, internalization and metabolism of calcium oxalate monohydrate crystals by renal epithelial cells. *Kidney Int* 52:1291.
4. Koul H, Kennington L, Nair G, Honeyman T, Menon M, Scheid C (1994) Oxalate-induced initiation of DNA synthesis in LLC-PK1 cells, a line of renal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 205:1632.
5. Scheid CR, Koul H, Hill WA, Lubernarod J, Jonassen J, Honeyman T, Kennington L, Kohli R, Hodapp J, Ayvazian P, Menon M (1996) Oxalate toxicity in LLC-PK1 cells, a line of renal epithelial cells. *J Urol* 155:1112.
6. Scheid CR, Koul H, Kennington L, Hill WA, Lubernarod J, Jonassen J, Honeyman T, Menon M (1995) Oxalate-induced damage to renal tubular cells. *Scanning Microsc* 9:1097.
7. Selvam R, Bijikuri T (1992) Effect of citrate feeding on free radical induced changes in experimental urolithiasis. *Indian J Exp Biol* 30:705.
8. Strohmaier WL, Bichler KH, Koch J, Balk KN, Wilbert DM (1993) Protective effect of verapamil on shock wave-induced renal tubular dysfunction. *J Urol* 150:27.
9. Saraca K, Kupeli B, Budak M, Kosar A, Kavukcu M, Durak I, Gogus O (1997) Influence of experimental spermatic cord torsion on the contralateral testes in rats: evaluation of tissue free oxygen scavenger enzyme levels. *Urol Int* 58:208.
10. Scheid C, Koul H, Hill WA, Lubernarod J, Kennington L, Honeyman T, Jonassen J, Menon M (1996) Oxalate toxicity in LLC-PK1 cells: role of free radicals. *Kidney Int* 49:413.
11. Benyi L, Weilberg Z, Puyun L (1995) Protective effects of nifedipine and allopurinol on high energy shock wave induced acute changes of renal function. *J Urol* 153:596.
12. Saraca K, Bakır K, Yagcı F, Topcu O, Akbay C, Sayın N, Korkmaz C (1999) Limitation of possible enhanced crystal deposition by verapamil in renal parenchyma after shock wave application in rabbit model. *J Endourol* 13:343.
13. Cohen PJ (1992) Allopurinol administered prior to hepatic ischemia in the rat prevents chemiluminescence following restoration of circulation. *Can J Anesth* 39:1090.
14. Parekh MH, Lobel R, O'Connor L, Leggett RE, Levin RM (2001) Protective effect of Vitamin E on the response of the rabbit bladder to partial outlet obstruction. *J Urol* 166:341.
15. Khan SR (1995) Calcium oxalate crystal interaction with renal tubular epithelium, mechanism of crystal adhesion and its impact on stone development. *Urol Res* 23:71.
16. Khan SR, Shevock PN, Hackett RL (1992) Acute hyperoxaluria, renal injury and calcium oxalate urolithiasis. *J Urol* 147:226.
17. Saraca K, Yagcı F, Bakır K, Erturhan S, Ucak R (2001) Renal tubular injury induced by hyperoxaluria: evaluation of apoptotic changes. *Urol Res* 29:34.
18. Ogawa Y, Yamaguchi K, Morozumi M (1990) Effects of magnesium salts in preventing experimental oxalate urolithiasis. *J Urol* 144:385.
19. Saraca K, Bakır K, Yagcı F, Erbagcı A, Topcu O, Uysal O (2000) Unilateral testicular torsion; protective effect of verapamil on contralateral testicular histology. *Urol Int* 62:159.
20. Saraca K, Ozer G, Soygur T, Yaman O, Ozer E, Ustun H, Yaman LS, Gogus O (1997) Preservation of shock-wave-induced renal histologic changes by Dermatatan sulphate. *Urology* 49:145.
21. Saraca K, Kosar A, Yaman O, Beduk Y, Durak I, Gogus O, Kavukcu M (1996) Evaluation of ischemia after ESWL: detection of free oxygen radical scavenger enzymes in renal parenchyma subjected to high energy shock waves. *Urol Int* 57:221.
22. Itoh Y, Yasui T, Okada A, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K (2005) Preventive effects of green tea on renal stone formation and the role of oxidative stress in nephrolithiasis. *J Urol* 173(1): 271–275.
23. Cho Hyuk Jin, Bae Woong Jin, Kim Su Jin, Hong Sung Hoo, Lee Ji Youl, Hwang Tae-Kon, Choi Yeong Jin, Hwang Sung Yeoun, Kim Sae Woong (2014) The inhibitory effect of an ethanol extract of the spores of *Lygodium japonicum* on ethylene glycol-induced kidney calculi in rats. *Urolithiasis* 42(4):309–315.
24. Butterweck V, Khan SR (2009) Herbal medicines in the management of urolithiasis: alternative or complementary? *Planta Med* 75(10):1095–1103.
25. Calixto JB, Santos AR, Cechinel Filho V et al (1998) A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. *Med Res Rev* 18:225.
26. Calixto JB, Yunes RA, Neto AS et al (1984) Antispasmodic effects of an alkaloid extracted from *Phyllanthus sellowianus*: a comparative study with papaverine. *Braz J Med Biol Res* 17:313.
27. Zadra M, Piana M, Brum TF, Boligon AA, Freitas RB, Machado MM, Stefanello ST, Soares FA, Athayde ML (2012) Antioxidant Activity and phytochemical composition of the leaves of *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil. *Molecules* 17(11):12560–12574.
28. Wang H, Yang L, Zu Y, Zhao X (2014) Microwave-assisted simultaneous extraction of luteolin and apigenin from tree peony pod and evaluation of its antioxidant activity. *Sci World J* 2014:506971.
29. Xi M, Hai C, Tang H, Chen M, Fang K, Liang X (2008) Antioxidant and antiglycation properties of total saponins extracted from traditional Chinese medicine used to treat diabetes mellitus. *Phytother Res* 22(2):228–237.
30. Atmani F, Slimani Y, Mimouni M et al (2004) Effect of aqueous extract from *Herniaria hirsuta* L. On experimentally nephrolithiasis rats. *J Ethnopharmacol* 95:87.
31. Nishiura JL, Campos AH, Boim MA et al (2004) *Phyllanthus niruri* normalizes elevated urinary calcium levels in calcium stone forming (CSF) patients. *Urol Res* 32:362.
32. Ariffin A, Rahman NA, Yehye WA, Alhadi AA (2014) Kadir FA: PASS-assisted design, synthesis and antioxidant evaluation of new butylated hydroxytoluene derivatives. *Eur J Med Chem* 2(87C):564–577.
33. Bodakhe KS, Namdeo KP, Patra KC, Machwal L, Pareta SK (2013) A polyherbal formulation attenuates hyperoxaluria-induced oxidative stress and prevents subsequent deposition of calcium oxalate crystals and renal cell injury in rat kidneys. *Chin J Nat Med* 11(5):466–471.