

УДК 615.324:615.272:616.613-003.7

DOI 10.31684/25418475_2021_2_105

ВЛИЯНИЕ КАРНОЗИНА НА ТЕЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОКСАЛАТНОГО НЕФРОЛИТИАЗА

Алтайский государственный медицинский университет, г. Барнаул

Жариков А.Ю., Кальницкий А.С., Мазко О.Н., Макарова О.Г., Бобров И.П., Жарикова Г.В.

Цель исследования – изучение влияния карнозина на течение экспериментального оксалатного нефролитиаза.

Заболевание моделировали 6 недель на 20 крысах линии Вистар, разделенных на группу сравнения (n=10) и подопытную группу (n=10), используя общепринятую этиленгликолевую модель. Начиная с 4 недели, подопытным крысам вводили карнозин в дозе 15 мг/кг. В моче крыс подопытных животных еженедельно измеряли биохимические показатели. После эвтаназии изымали почки крыс обеих групп для определения активности процессов свободнорадикального окисления и для проведения гистологических исследований. По результатам исследования, концентрация тиобарбитуратреактивных продуктов и активность супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы в подопытной группе были в 2,3, 2,2 и 5,4 раза соответственно ниже, чем в группе сравнения. Параллельно происходило повышение общей антиоксидантной активности и активности каталазы в 2,7 и 1,5 раза соответственно. Уровень активности лактатдегидрогеназы и γ -глутамилтранспептидазы статистически значимо возрастали до 4 недели исследования, а на фоне введения карнозина вернулись к исходным показателям к концу эксперимента. Оксалатные конкременты у подопытных крыс были обнаружены в 10% случаев против 100% у животных группы сравнения.

Ключевые слова: оксалатный нефролитиаз, карнозин.

EFFECT OF CARNOSINE ON THE COURSE OF EXPERIMENTAL OXALATE NEPHROLITHIASIS

Altai State Medical University, Barnaul

A.Yu. Zharikov, A.S. Kalnitskiy, O.N. Mazko, O.G. Makarova, I.P. Bobrov, G.V. Zharikova

The research objective was to study the effect of carnosine on the course of experimental oxalate nephrolithiasis.

The disease was simulated for 6 weeks in 20 Wistar rats divided into a comparison group (n=10) and an experimental group (n=10), using the conventional ethylene glycol model. Starting at week 4, the experimental rats were injected with carnosine at a dose of 15 mg/kg. In the urine of rats of experimental animals, the biochemical parameters were measured weekly. After euthanasia, kidneys were removed from rats of both groups to determine the activity of free radical oxidation processes and for histological studies.

According to the results of the study, the concentration of thiobarbituric reactive products and the activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in the experimental group were 2.3, 2.2 and 5.4 times lower, respectively, than in the comparison group. In parallel, the total antioxidant status and catalase activity increased by 2.7 and 1.5 times, respectively. The level of activity of lactate dehydrogenase and γ -glutamyl transpeptidase increased statistically significantly up to 4 weeks of the study, and with the introduction of carnosine returned to the initial values by the end of the experiment. Oxalate concretions were found in experimental rats in 10% of cases versus 100% in animals of the comparison group.

Keywords: oxalate nephrolithiasis, carnosine.

Мочекаменная болезнь (МКБ) является одной из наиболее распространенных урологических патологий, на долю которой приходится около 5% в общей структуре заболеваемости населения [1]. Наиболее распространенной формой МКБ является оксалатный нефролитиаз (более 60% случаев МКБ) [2].

Известно, что важным звеном патогенеза оксалатного нефролитиаза является повышение активности процессов свободнорадикального окисления (СРО) [3, 4]. В связи с этим перспек-

тивным направлением лечения данной патологии может стать антиоксидантная терапия.

Ранее нами было показано, что молекулы коротких пептидов оказывают выраженный литолитический эффект в отношении экспериментального оксалатного нефролитиаза [5, 6].

Поэтому одним из наиболее перспективных биологически активных веществ для разработки инновационного средства для лечения оксалатного нефролитиаза может стать дипептид карнозин, который, с одной стороны, известен

своими выраженными антиоксидантными свойствами, в том числе при диабетической нефропатии [7], а с другой стороны, имеет строение короткого пептида, что позволяет предполагать выраженный литолитический эффект в отношении конкрементов щавелевокислого кальция. Кроме того, ранее нами была выявлена возможность применения карнозина для эффективной фармакологической коррекции уратного нефролитиаза [8].

Цель исследования – изучить влияние карнозина на течение экспериментального оксалатного нефролитиаза.

Материалы и методы

Исследование было проведено с использованием 20 самцов крыс линии Вистар, содержащихся в индивидуальных метаболических клетках на стандартном лабораторном рационе. Крысы были разделены на подопытную группу (n=10) и группу сравнения (n=10). В обеих группах, согласно общепринятой модели, в течение 6 недель моделировался экспериментальный оксалатный нефролитиаз путем предоставления крысам в качестве питья 1% раствора этиленгликоля [9]. Начиная с 4 недели эксперимента, животные подопытной группы внутрижелудочно через зонд получали раствор карнозина в дозировке 15 мг/кг [8].

Перед началом эксперимента, а также еженедельно на всем протяжении исследования производился сбор суточной мочи животных подопытной группы с последующим определением экскреции кальция и креатинина, а также активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и γ -глутамилтранспептидазы (ГТП). Определение выполнялось на биохимическом анализаторе CS-T240.

По окончании 6 недели эксперимента у животных обеих групп, подвергнутых эвтаназии с применением диэтилового эфира, были взяты обе почки, одна – для определения уровня активности окислительных процессов, связанных с действием активных форм кислорода (АФК), а другая – для выполнения гистологического исследования с целью оценки степени поражения почечной ткани оксалатными конкрементами.

Для оценки выраженности действия АФК в гомогенате почек лабораторных животных проводилось определение концентрации тиобарбитуратреактивных продуктов (ТБРП), общей прооксидантной активности (ОПА), общей антиоксидантной активности (ОАА), а также активности каталазы (КАТ), супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГПО). Определение выполнялось с использованием общепринятых методик [10].

Гистологические исследования проводили после фиксации тканей почек в 10% растворе формалина. Проводку биоматериала выполня-

ли на аппарате TISSUE-TEK VIPTM6 (Sakura, Япония), после чего на приборе Accu-Cut SRM (Sakura, Япония) изготавливали срезы средней толщиной 6 мм. Для выявления камней щавелевокислого кальция проводили окраску образцов нитратом серебра по Косса. Микропрепараты рассматривали под увеличением $\times 400$ на электронном микроскопе Nikon Eclipse E200 (Китай). Исследуемыми характеристиками являлись площадь и число оксалатных конкрементов, а также выраженность воспалительных и дисфункциональных изменений в тканях почек экспериментальных крыс.

Все данные, полученные в ходе проведения исследования, были обработаны при помощи методов статистического анализа, принятых для использования в фармакологических исследованиях [11]. Так, статистическую значимость внутригрупповых различий биохимических исследований проверяли с использованием рангового критерия Вилкоксона, а значимость межгрупповых различий – с использованием рангового критерия Манна-Уитни. Оценка вариабельности данных проводилась путем определения медианы и интерквартильного размаха. Для выявления уровня статистической значимости отличий качественных морфологических характеристик проводили Q-тест Кохрена. В качестве программного обеспечения был задействован пакет Statistica 12.0, адаптированный для Windows. Решение о признании значимости различий принималось при значении $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Исследования активности окислительных процессов показали, что в гомогенате почек крыс, получавших раствор карнозина, концентрация ТБРП была статистически значимо ниже аналогичного показателя группы сравнения в 2,3 раза. При этом ОАА и активность КАТ в почках подопытных крыс была статистически значимо выше, чем в группе сравнения, в 2,7 и 1,5 раза соответственно. На этом фоне активность СОД и ГПО у крыс, получавших карнозин, статистически значимо снизились относительно значений, полученных при анализе почек крыс группы сравнения, в 2,2 и 5,4 раза соответственно (таблица 1).

По результатам биохимических исследований было выявлено, что активность лактатдегидрогеназы в почках крыс, начиная со 2 недели эксперимента, была от 4 до 5 раз статистически значимо выше исходной (таблица 2), а к заключительной неделе исследования статистически значимо не отличалась от исходного уровня.

Активность же ГТП статистически значимо возрастала с середины 3 недели исследования, достигнув пика на 4 неделе эксперимента, будучи в 2,7 раза выше аналогичного показателя,

измеренного перед началом эксперимента (таблица 2), однако показатели активности ГТП, измеренные во время последней недели ис-

следования, не имели статистически значимых различий с первоначальными значениями.

Таблица 1

Значения показателей активности процессов свободнорадикального окисления в гомогенате почек экспериментальных животных

Группа	ТБРП	ОПА	ОАА	КАТ	СОД	ГПО
Группа сравнения	7,6 (7,2;7,6)	54,0 (49,9;56,8)	12,0 (10,4;13,2)	12,2 (9,0;15,8)	25,1 (23,6;32,1)	42,2 (32,2;47,9)
Подопытная группа	3,3 (1,5;4,0) P=0,005	44,0 (35,6;53,0)	32,7 (31,3;35,5) P=0,005	18,7 (15,8;19,1) P=0,028	11,3 (11,0;11,8) P=0,005	7,8 (6,4;9,3) P=0,005

Примечания: вариабельность данных представлена медианой с указанием 25 и 75 перцентилей; P – уровень статистической значимости межгрупповых различий.

Кроме того, обращает на себя внимание статистически значимое повышение диуреза и суточной экскреции кальция во вторую половину исследования (таблица 2). Так, диурез с 4 по 6 неделю эксперимента был статистически зна-

чимо выше исходного показателя от 2,5 до 3,1 раза, экскреция кальция – от 1,3 до 2,2 раза. Показатели экскреции креатинина не имели значимых различий относительно исходного уровня (в таблице не представлены).

Таблица 2

Значения биохимических показателей в моче экспериментальных животных

Группа	Диурез, мл/сутки	Кальций экскр, мкмоль/сутки	ЛДГ, У/мг креатинина в сутки	ГТТ, У/мг креатинина в сутки
Исходный уровень	1,4 (1,1;2,2) n=10	6,8 (5,7;8,7) n=10	0,01 (0,004;0,03) n=10	0,18 (0,07;0,27) n=10
1 неделя	2,1 (1,5;3,4) n=10 p _{н/у} =0,015	6,4 (5,8;7,3) n=10	0,05 (0,02;0,07) n=10 p _{н/у} =0,022	0,41 (0,27;0,43) n=10
2 неделя	1,7 (1,1;4,0) n=10	5,5 (3,8;6,2) n=10	0,05 (0,03;0,08) n=10 p _{н/у} =0,022	0,47 (0,29;0,77) n=10 p _{н/у} =0,030
3 неделя	1,7 (1,1;2,5) n=10	6,0 (4,7;8,4) n=10	0,04 (0,02;0,08) n=9 p _{н/у} =0,008	0,44 (0,32;0,60) n=10 p _{н/у} =0,047
Начало введения карнозина				
4 неделя	4,4 (3,2;5,6) n=10 p _{н/у} =0,005	12,6 (7,2;14,3) n=10 p _{н/у} =0,009	0,05 (0,04;0,08) n=10 p _{н/у} =0,007	0,49 (0,41;0,61) n=10 p _{н/у} =0,017
5 неделя	3,5 (2,4;5,2) n=10 p _{н/у} =0,012	9,0 (7,5;14,5) n=10 p _{н/у} =0,007	0,04 (0,02;0,05) n=10 p _{н/у} =0,047	0,32 (0,24;0,55) n=10
6 неделя	4,1 (3,8;6,6) n=10 p _{н/у} =0,005	14,9 (9,6;17,5) n=10 p _{н/у} =0,005	0,03 (0,03;0,04) n=10	0,27 (0,24;0,38) n=10

Примечания: вариабельность данных представлена медианой с указанием 25 и 75 перцентилей; p_{н/у} – уровень статистической значимости изменения показателя внутри группы относительно исходного уровня.

По результатам гистологического исследования, в почках животных группы сравнения конкременты были обнаружены в 10 из 10 (100%) случаев. Среднее количество депозитов составило $7,9 \pm 1,6$, а средняя площадь – $298,8 \pm 34,2$ мкм².

При этом в почках крыс подопытной группы депозиты были выявлены в 1 из 10 (10%) случаев (Q-тест Кохрена, $p=0,003$ относительно группы сравнения). Количество депозитов в среднем составило $5,0 \pm 0,7$ в поле зрения при увеличении $\times 400$, пределы колебаний числа депозитов варьировались от 1 до 10. Средняя площадь депозитов составила $285,9 \pm 21,2$ мкм², пределы колебаний варьировались от $45,2$ мкм² до $785,9$ мкм².

Таким образом, по результатам исследования можно заключить, что при применении карнозина существенно снижается степень выраженности оксалатного нефролитиаза, а также уменьшается степень оксидативного поражения почечной ткани.

Так, важнейшим показателем уменьшения активности процессов свободнорадикального окисления является статистически значимое снижение в гомогенате почек крыс, получавших карнозин, концентрации ТБРП – основного продукта окисления фосфолипидов мембран [12]. Кроме того, значимое увеличение ОАА относительно группы сравнения свидетельствует о высоком уровне защиты от агрессивного действия АФК, достигаемого с помощью введения карнозина. При этом статистически значимое снижение активности СОД и ГПО у подопытных крыс свидетельствует о существенном снижении активности АФК, так как СОД и ГПО участвуют в обезвреживании наиболее агрессивных свободных радикалов [13], по-видимому, нейтрализованных путем проявления карнозином прямых антиоксидантных свойств.

Стоит отметить, что одним из характерных диагностических признаков развития оксалатного нефролитиаза является прогрессирующий рост активности ЛДГ, наиболее выраженный во вторую половину моделирования патологии [5, 6]. ЛДГ в норме локализуется исключительно внутриклеточно, и определение данного энзима в моче является свидетельством разрушения нефроцитов [14]. Следовательно, статистически значимое возвращение показателя активности ЛДГ к исходному уровню на фоне применения карнозина свидетельствует о прекращении дальнейшего развития патологического процесса. Кроме того, весомым свидетельством снижения выраженности заболевания является статистически значимое восстановление исходных показателей активности ГТП в моче, достигнутое на 6 неделе эксперимента.

Наконец, одним из ключевых доказательств выраженного антилитогенного действия карнозина при экспериментальном оксалатном нефролитиазе являются результаты гистологи-

ческого исследования, в ходе которого оксалатные депозиты были выявлены только в 1 случае из 10, против 100%-го наличия камней в почках крыс группы сравнения ($p=0,003$).

Заключение

При применении карнозина в дозе 15 мг/кг на фоне 6-недельного экспериментального оксалатного нефролитиаза наблюдается выраженное антилитогенное действие, характеризующееся уменьшением количества случаев развития нефролитиаза, нормализацией биохимических показателей, а также улучшением показателей антиоксидантной защиты.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Knoll T. Epidemiology, Pathogenesis, and Pathophysiology of Urolithiasis. *Eur Urol Suppl.* 2010; 9: 802-806.
2. Spivacow F.R., Del Valle E.E., Lores E., Rey P.G. Kidney stones: Composition, frequency and relation to metabolic diagnosis. *Medicina.* 2016; 76(6): 343-348.
3. Перфильев В.Ю., Жариков А.Ю., Лукьяненко Д.Ю., Лысенко И.В. Активность свободнорадикального окисления в крови крыс на фоне экспериментальной уратной нефропатии. *Медицинский академический журнал.* 2016; 16(4): 188-189.
4. Khan S.R. Stress oxidative: nephrolithiasis and chronic kidney diseases. *Minerva Med.* 2013; 104(1): 23-30.
5. Жариков А.Ю., Якушев Н.Н., Жарикова Г.В., Мазко О.Н., Макарова О.Г., Лепилов А.В., Бобров И.П. Влияние трипептида Leu-Phe-Lys на течение экспериментального оксалатного нефролитиаза. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2019; 167(6): 704-708.
6. Жариков А.Ю., Якушев Н.Н., Мазко О.Н., Макарова О.Г. Влияние тетрапептида Leu-Phe-Lys-Met на функцию почек при экспериментальном оксалатном нефролитиазе. *Астраханский медицинский журнал.* 2020; 15(3): 64-71.
7. Peters V., Yard B., Schmitt C.P. Carnosine and Diabetic Nephropathy. *Curr. Med. Chem.* 2020; 27(11): 1801-1812.
8. Кальницкий А.С., Жариков А.Ю., Мазко О.Н., Макарова О.Г., Бобров И.П., Азарова О.В. Влияние карнозина на течение экспериментального уратного нефролитиаза. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2021; 171(2): 182-185.
9. Жариков А.Ю., Брюханов В.М., Зверев Я.Ф., Лампатов В.В. Современные методы моделирования оксалатного нефролитиаза. *Нефрология.* 2008; 12(4): 28-35.
10. Брюханов В.М., Зверев Я.Ф., Лампатов В.В. Жариков А.Ю., Талалаева О.С. *Методы до-*

клинического (экспериментального) исследования влияния лекарственных средств на функцию почек. Новосибирск: Гео, 2013. 84 с.

11. Хафизьянова Р.Х., Бuryкин И.М., Алеева Г.Н. *Математическая статистика в экспериментальной и клинической фармакологии*. Казань: Медицина, 2006. 374 с.

12. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem*. 2017; 524: 13-30.

13. Филинова С. О., Жариков А. Ю., Мазко О. Н., Макарова О. Г., Баландович Б. А. Показатели прооксидантного и антиоксидантного статусов в почках крыс при экспериментальном сахарном диабете. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2020; 64(1): 124-127.

14. Kabakov A.E., Gabai V.L. Cell Death and Survival Assays. *Methods Mol. Biol*. 2018; 1709: 107-127.

References:

1. Knoll T. Epidemiology, Pathogenesis, and Pathophysiology of Urolithiasis. *Eur Urol Suppl*, 2010; 9: 802-806.

2. Spivacow F.R., Del Valle E.E., Loes E., Rey P.G. Kidney stones: Composition, frequency and relation to metabolic diagnosis. *Medicina*. 2016; 76(6): 343-348.

3. Perfiliev V.Yu., Zharikov A.Yu., Lukyanenko D.Yu., Lysenko I.V. The activity of free radical oxidation in the blood of rats against the background of experimental urate nephropathy. *Medical Academic Journal*. 2016; 16(4): 188-189. (In Russ.)

4. Khan S.R. Stress oxidative: nephrolithiasis and chronic kidney diseases. *Minerva Med*. 2013; 104(1): 23-30.

5. Zharikov A.Y., Yakushev N.N., Zharikova G.V., Mazko O.N., Makarova O.G., Lepilov A.V., Bobrov I.P. Effect of tripeptide Leu-Ile-Lys on the course of experimental nephrolithiasis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2019; 167(6): 704-708. (In Russ.)

6. Zharikov A.Yu., Yakushev N.N., Mazko O.N., Makarova O.G. Influence of Leu-Ile-Lys-Met tetrapeptide on the kidney function at experimental oxalate nephrolithiasis. *Astrakhan Medical Journal*. 2020; 15(3): 64-71. (In Russ.)

7. Peters V., Yard B., Schmitt C.P. Carnosine and Diabetic Nephropathy. *Curr. Med. Chem*. 2020; 27(11): 1801-1812.

8. Kalnitskiy A.S., Zharikov A.Yu., Mazko O.N., Makarova O.G., Bobrov I.P., Azarova O.V. Effect of carnosine on the course of experimental urate nephrolithiasis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2021; 171(2): 182-185. (In Russ.)

9. Zharikov A.Yu., Bryukhanov V.M., Zverev Ya.F., Lampatov V.V. Current methods of model-

ing of oxalate nephrolithiasis. *Nephrology*. 2008; 12(4): 28-35. (In Russ.)

10. Bryukhanov V.M., Zverev Ya.F., Lampatov V.V., Zharikov A.Yu., Talalaeva O.S. *Methods of pre-clinical (experimental) research of the effect of medicines on renal function*. Novosibirsk: Geo, 2013. 84 p. (In Russ.)

11. Khafiziyanova R.Kh., Burykin I.M., Aleeva G.N. *Mathematical statistics in experimental and clinical pharmacology*. Kazan: Meditsina, 2006. 374 p. (In Russ.)

12. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem*. 2017; 524: 13-30.

13. Filinova S.O., Zharikov A. Yu., Mazko O.N., Makarova O.G., Balandovich B.A. Indicators of prooxidant and antioxidant statuses in the kidneys of rats with experimental diabetes mellitus. *Pathological Physiology and Experimental Therapy*. 2020; 64(1): 124-127. (In Russ.)

14. Kabakov A.E., Gabai V.L. Cell Death and Survival Assays. *Methods Mol. Biol*. 2018; 1709: 107-127.

Контактные данные

Автор, ответственный за переписку:

Кальницкий Артем Сергеевич, преподаватель кафедры фармакологии Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.

656038, г. Барнаул, ул. Папанинцев, 126.

Тел.: (3852) 566891.

E-mail: artem_kalnitsky@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-3500-3052>

Информация об авторах

Жариков Александр Юрьевич, д.б.н., доцент, заведующий кафедрой фармакологии Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.

656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40.

Тел.: (3852) 566-891.

E-mail: zharikov_a_y@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-4884-220X>

Мазко Олеся Николаевна, к.б.н., доцент кафедры фармакологии Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.

656038, г. Барнаул, ул. Папанинцев, 126.

Тел.: (3852) 566891.

E-mail: olesia.mazko@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0001-7299-4516>

Макарова Олеся Геннадьевна, к.фарм.н., доцент кафедры фармакологии Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.

656038, г. Барнаул, пер. Некрасова, 65.

Тел.: (3852) 566893.

E-mail: olesia552@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7771-9468>

Бобров Игорь Петрович, д.м.н., профессор кафедры судебной медицины имени профессора В.Н. Крюкова и патологической анатомии с курсом ДПО Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул. 656050, г. Барнаул, ул. Юрина, 168 Н. Тел.: (3852) 566945.

E-mail: ig.bobrov2010@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9097-6733>

Жарикова Ганна Викторовна, к.б.н., доцент кафедры общей и биологической химии, клинической лабораторной диагностики Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.

656038, г. Барнаул, ул. Папанинцев, 126. Тел.: (3852) 566938.

E-mail: ganna1704@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3227-2348>

Поступила в редакцию 27.04.2021

Принята к публикации 20.05.2021

Для цитирования: Жариков А.Ю., Кальницкий А.С., Мазко О.Н., Макарова О.Г., Бобров И.П., Жарикова Г.В. Влияние карнозина на течение экспериментального оксалатного нефролитиаза. *Бюллетень медицинской науки.* 2021;2(22): 105–110.

Citation: Zharikov A.Yu., Kalnitskiy A.S., Mazko O.N., Makarova O.G., Bobrov I.P., Zharikova G.V. Effect of carnosine on the course of experimental oxalate nephrolithiasis. *Bulletin of Medical Science.* 2021;2(22): 105–110. (In Russ.)