

УДК 612.466.1.2

ХРОНИЧЕСКОЕ ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ФТОРИДА НАТРИЯ НА ФУНКЦИИ ПОЧЕК КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Плахтий Л.Я., Еналдиева Д.А., Бибаева Л.В., Кониева А.А.,
Дзахова Г.А., Цховребов А.Ч.

ГБОУ ВПО СОГМА Минздрава России, РСО-Алания, Владикавказ, e-mail: L.bi.bio@yandex.ru

Целью данной работы было экспериментальное изучение механизмов влияния хронической интоксикации фторидом натрия на функции почек у крыс. Ежедневное, в течение месяца, внутрижелудочное введение крысам линии Вистар раствора фторида натрия в дозе 1,25 мг/кг приводит к созданию модели хронической фторидной интоксикации с изменением морфологического состояния почек по типу мембранозного интракапиллярного гломерулонефрита, характеризующегося застойным полнокровием сосудов интерстиция и клубочков и дистрофическими повреждениями эпителиоцитов канальцев почек. Это ведет к угнетению водного и спонтанного диуреза вследствие снижения скорости клубочковой фильтрации и усиления канальцевой реабсорбции воды, вызывает протеинурию и снижение содержания общего белка в крови. Также снижается экскреция мочевины и происходит накопление ее в ткани почек, что ведет к повышению осмотического давления.

Ключевые слова: фторид натрия, функции почек, диурез, протеинурия, гипопроteinемия

CHRONIC SODIUM FLUORIDE TOXICITY INFLUENCE ON THE RAT KIDNEY IN EXPERIMENT

Plakhtiy L.Y., Enaldieva D.A., Bibaeva L.V., Konieva A.A., Dzakhova G.A.,
Tskhovrebov A.C.

North Ossetian State Medical Academy, Vladikavkaz, e-mail: L.bi.bio@yandex.ru

The aim of present paper was the experimental studying of the chronic sodium fluoride intoxication influence mechanisms on function of rat kidneys. Daily, during a month, intragastric introduction of sodium fluoride solution in a dose of 1,25 mg/kg to Vistar rats leads to formation of chronic fluoride intoxication model with the change of kidneys morphological condition like membrane intercapillary glomerulonephritis, being characterized by blood stasis in vessels of an interstition and glomeruli and dystrophic damages of renal tubular epitheliocytes. This lead to reducing water and spontaneous diuresis due to decreasing of glomerular filtration rate and strengthening tubular reabsorptions, causes a proteinuria and decrease the total protein in blood. Also the urea excretion was decreased and it is accumulate in renal tissue that leads to increase of osmotic pressure.

Keywords: sodium fluoride, kidney function, diuresis, proteinuria, hypoproteinemia

Фтор – микроэлемент, необходимый для нормальной жизнедеятельности человека. Суточное поступление фтора для взрослого человека составляет около 4 мг, при этом 20–25% его поступает с пищей, а остальное – в виде растворенных фторидов с питьевой водой.

Основная биологическая роль фтора и его соединений – костеобразование, формирование дентина, зубной эмали, предупреждение развития старческого остеопороза, хотя при интоксикации высокими дозами он проникает через плацентарный барьер и нарушает формирование костной ткани у плода [1, 4]. Фтор участвует и во многих биохимических реакциях в качестве как активатора ферментов (аденилатциклазы), так и ингибитора ферментов (липазы, эстеразы и лактатдегидрогеназы), метаболизма йода и тиреоидных гормонов, синтеза нуклеиновых кислот, белков и липидов [8]. Кроме того, высокие концентрации фтора усиливают процесс перекисного окисления липидов и угнетают систему антиоксидантной защиты [3, 5].

Загрязнение окружающей среды соединениями фтора приводят к серьезной проблеме – флюорозу [2, 6, 7].

Большая часть соединений фтора выводятся почками, в связи с чем важно исследовать функциональную активность почек в условиях фторидной интоксикации.

Материалы и методы исследования

Исследования проводились на 80 половозрелых крысах линии Wistar, весом от 120 до 210 г, что соответствует массе взрослых особей. Во время экспериментов все животные находились в лабораторном виварии со свободным доступом к пище и воде.

Модель экспериментальной фторидной интоксикации создавалась на крысах ежедневным введением им раствора фторида натрия (NaF) внутрижелудочно через зонд в дозе 1,25 мг/кг в течение 1 месяца. Контрольные крысы получали водопроводную воду с поваренной солью с эквивалентной концентрацией натрия.

Исследование функции почек проводилось в конце 1, 2 и 4 недели эксперимента как в условиях водного, так и спонтанного диуреза. Водная нагрузка создавалась введением через зонд в желудок водопроводной воды в объеме 5% массы тела. При водной нагрузке мочу собирали в метаболических клетках в течение 3 часов. При спонтанном диурезе – в течение 6 часов. У всех животных исследовались следующие параметры: содержание общего белка мочи (по методу Лоури), мочевины (наборами «Лахема»), эндогенного креатинина (по Попперу). Также на каждом сроке часть животных выводили из эксперимента. У них

производили забор крови и исследовали содержание эндогенного креатинина (по методу Поппера), общего белка (биуретовым методом). У всех выведенных из эксперимента животных производили забор почек, в ткани слоев которых определяли количество мочевины и натрия. Скорость почечного кровотока изучали инвазивным способом с помощью флуометра Transonic HT 313 (США). Также производили гистологическое исследование срезов почек, окрашенных гематоксилин-эозином.

Результаты исследования и их обсуждение

При изучении влияния фторида натрия на функцию почек было выявлено, что у крыс с хронической интоксикацией через одну неделю водный диурез за первые два часа с уровня контроля в $1,72 \pm 0,13$ мл/ч/100 г (первый час) и $1,61 \pm 0,11$ мл/ч/100 г (второй час) увеличился на 30,2% ($p < 0,02$) и 22,3% ($p < 0,05$) соответственно. За третий час количество выделившейся мочи особо не изменилось, но суммарный трехчасовой диурез был достоверно ($p < 0,05$) повышенным, и процент выделившейся мочи за три часа составлял $98,42 \pm 6,04\%$ против $80,02 \pm 5,88\%$ контроля.

К концу второй недели интоксикации диурез за первые два часа снизился до нормы, и суммарный трехчасовой диурез в $4,17 \pm 0,3$ мл/3 ч/100 г был всего лишь на 3,9% больше контроля. При завершении опытов, еще спустя две недели, произошло снижение водного диуреза за все три часа ($p < 0,001$): на 46,6% – за первый час, на 51,9% – за второй и на 41,9% – за третий час, то есть месячная интоксикация крыс привела почти к двукратному (на 47,4%) снижению водного диуреза.

В условиях спонтанного диуреза хроническая интоксикация вызвала аналогичные изменения – первоначальное, через одну неделю, усиление диуреза с его нормализацией к концу второй и снижением на 49,8% при месячной интоксикации.

При определении содержания креатинина в моче было показано снижение его экскреции, в то же время отмечалось повышение его концентрации в крови. Более того, даже при нормализации диуреза к концу второй недели уровень креатинина в крови продолжал повышаться.

Также через одну неделю у крыс с хронической интоксикацией в условиях водного диуреза произошло повышение скорости клубочковой фильтрации за первые два часа с контрольных уровней в $17,56 \pm 1,48$ мл/ч/100 г и $16,75 \pm 1,33$ мл/ч/100 г на 31,6% ($p < 0,02$) и 37,1% ($p < 0,002$) соответственно. И хотя за третий час клубочковая фильтрация уже не отличалась от контроля, но суммарная

трехчасовая скорость клубочковой фильтрации достоверно ($p < 0,01$) повысилась на 28,8%. Канальцевая реабсорбция воды в среднем за три часа у крыс экспериментальных животных ($92,62 \pm 0,53\%$) не достоверно отличалась от животных контрольной группы ($91,9 \pm 0,38\%$), но из-за значительного усиления клубочковой фильтрации диурез у экспериментальных крыс был повышенным.

После двухнедельной интоксикации основные процессы мочеобразования (фильтрация и реабсорбция) не сильно отличались от контрольной группы. Однако по завершении эксперимента расчет основных процессов мочеобразования за три часа показал достоверные ($p < 0,01$) снижение скорости клубочковой фильтрации и повышение канальцевой реабсорбции воды ($50,24 \pm 3,26$ мл/3 ч/100 г и $91,94 \pm 0,45\%$ – контроль, $38,44 \pm 2,84$ мл/3 ч/100 г и $93,96 \pm 0,52\%$ – опыт). То есть как снижение фильтрации, так и усиление реабсорбции стимулировали снижение водного диуреза, поэтому он был так существенно (на 47,4%) снижен.

Изменения основных процессов мочеобразования у крыс в условиях спонтанного диуреза при хронической интоксикации были во многом сходны с результатами, полученными после водной нагрузки.

Для объяснения механизма наблюдаемых изменений клубочковой фильтрации и канальцевой реабсорбции воды мы исследовали скорость почечного кровотока и осмотическое давление ткани почек.

Через одну неделю хронической интоксикации скорость почечного кровотока с контрольного значения в $13,15 \pm 1,28$ мл/мин достоверно ($p < 0,02$) повысилась до $18,85 \pm 1,4$ мл/мин, а в конце месяца и после недельной острой интоксикации произошло её снижение на 27,6% ($p < 0,02$) и 24,2% ($p < 0,05$) соответственно. Эти изменения кровотока в почках, несомненно, должны были повлечь за собой снижение скорости клубочковой фильтрации, что мы и отмечали.

Для объяснений изменений канальцевой реабсорбции воды, которая зависит в том числе и от осмотического давления в интерстициальной жидкости, создаваемого мочевиной и натрием, исследовалось их содержание в слоях ткани почек. Недельное введение фторида натрия в дозе 1,25 мг/кг снизило уровень мочевины и натрия во всех слоях ткани почек: в корковом веществе – на 7,3 и 8,0% (контроль $26,42 \pm 1,41$ мкмоль/г влажного веса и $21,97 \pm 1,25$ мкмоль/г сухого веса соответственно), в мозговом веществе – на 15,2% ($p < 0,05$)

и 11,0%, а в почечном сосочке – на 17,5% ($p < 0,05$) и 10,0%.

Продолжение интоксикации еще в течение одной недели характеризовалось повышением уровня мочевины в корковом веществе на 11,2%, в мозговом веществе на 23,8% ($p < 0,05$) и на 7,6% в почечном сосочке, а уровень натрия стал ниже того значения, которое отмечалось в конце второй недели, а так как степень их изменений была примерно одинаковой, то ни осмолярность, ни канальцевая реабсорбция воды не изменились, а при скорости клубочковой фильтрации, близкой к норме, диурез после двухнедельного введения фторида натрия остался на уровне контроля.

При месячном введении фторида натрия содержание мочевины в корковом веществе увеличилось на 19,7% ($p < 0,02$), в мозговом веществе – с уровня контроля в $53,69 \pm 2,67$ мкмоль/г влажного веса на 38,2% ($p < 0,001$) и в почечном сосочке, где содержание мочевины у контрольных крыс было равно $169,43 \pm 10,21$ мкмоль/г влажного веса, – на 29,6% ($p < 0,01$). То есть повышение содержания мочевины, а следовательно, и осмолярности после месячного введения фторида натрия способствовало отмеченному увеличению канальцевой реабсорбции воды, что снижало диурез, особенно на фоне сниженной клубочковой фильтрации.

Определение содержания воды в слоях ткани почек показало, что после недельного и двухнедельного введения фторида натрия не было особых изменений, а в месячных опытах во всех слоях почек отмечалось достоверное повышение содержания воды с градиентом от коркового вещества до почечного сосочка: на 1,6% – в корковом веществе ($p < 0,05$), на 2,5% – в мозговом веществе ($p < 0,02$) и на 2,9% – в почечном сосочке ($p < 0,01$).

Причиной повышения содержания мочевины в ткани почек при хронической интоксикации, вероятно, могла быть сниженная скорость почечного кровотока. Очевидно, что при этом должен меняться уровень мочевины в плазме крови и ее экскреция с мочой. Проведенные исследования показали, что при хронической интоксикации в условиях водного диуреза уже с первой недели экскреция мочевины за первые два часа начала снижаться, но без достоверного отличия, однако в экспериментах, поставленных в конце второй недели, мочевины с мочой стало выделяться достоверно меньше: за первый час ($76,73 \pm 5,13$ мкмоль/ч/100 г – контроль, $62,52 \pm 4,23$ мкмоль/ч/100 г – опыт, $p < 0,05$)

и за второй ($72,22 \pm 4,65$ мкмоль/ч/100 г – контроль, $58,13 \pm 3,78$ мкмоль/ч/100 г – опыт, $p < 0,05$). Но наибольшее снижение, в том числе и за третий час, произошло после месячного ежедневного введения фторида натрия, когда суммарная трехчасовая экскреция мочевины с уровня контроля в $238,2 \pm 15,68$ мкмоль/3 ч/100 г снизилась до $169,48 \pm 12,23$ мкмоль/3 ч/100 г ($p < 0,001$).

В условиях спонтанного диуреза на фоне хронической интоксикации выделение с мочой мочевины также от первой недели проведения экспериментов до их окончания снижалось (на 5,5% – через одну неделю, на 17,4% – через две и на 31,2% – в конце месяца).

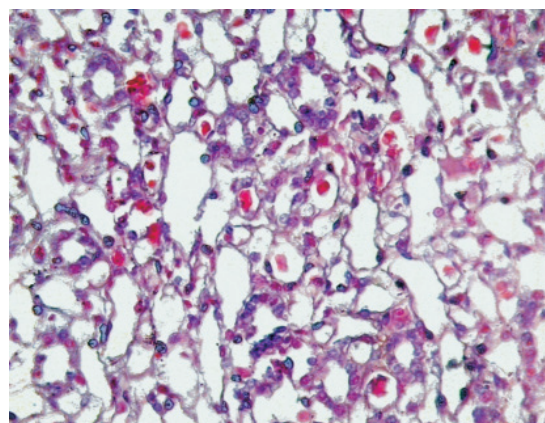
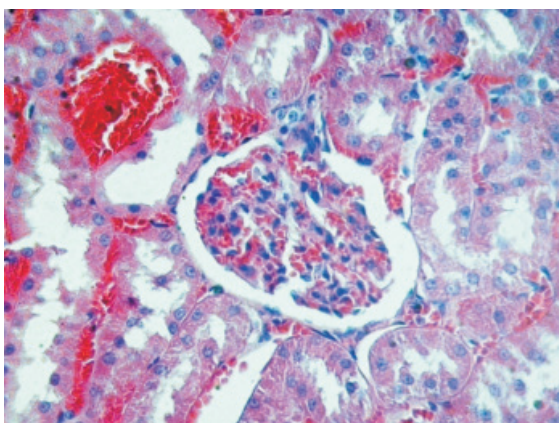
Одновременно со снижением экскреции мочевины повышался её уровень в плазме крови, который после двух недель хронической интоксикации достоверно ($p < 0,05$) отличался от контроля и к концу месяца превысил норму в 1,98 раза.

Недельное введение крысам фторида натрия в условиях водного диуреза лишь только способствовало повышению содержания белка в моче, но без достоверного отличия, хотя за три часа его концентрация возросла на 11,5%, а при продолжении интоксикации еще в течение одной недели уже стало достоверно больше, возрасшая от первого часа к третьему: за первый час степень протеинурии увеличилась на 43,0% ($p < 0,002$), за второй – на 80,8% ($p < 0,001$) и за третий – в 2,05 раз. Одновременно с нарастающей протеинурией в плазме крови начало снижаться содержание общего белка.

То, что двухнедельное введение крысам фторида натрия способствовало развитию протеинурии, показателя поражения клубочков и проксимального отдела канальцев почек, но при этом отмеченный ранее диуретический эффект нивелировался, подтверждает наше предположение, что к концу второй недели интоксикации проходит острый период нарушений функции почек и наступает подострый, переходящий в хронический. Месячная интоксикация вызвала наиболее выраженные изменения, в том числе и по содержанию в плазме крови ($54,64 \pm 3,25$ г/л, $p < 0,01$). Очевидно, что причиной гипопроteinемии была протеинурия, которая за первый час увеличилась до $5,72 \pm 0,35$ мг/мл, что было больше контроля в 2,9 раза, а за второй и третий часы – в 3,3 и 2,6 раза. Степень протеинурии и содержание общего белка плазмы крови в условиях спонтанного диуреза были аналогичные данным, полученным при водном диурезе.

Гистологическое исследование почек показало, что через одну неделю введения натрия фторида в дозе 1,25 мг/кг отмечался неравномерный застой микроциркуляции с разнородным эпителием канальцев. В конце второй недели интоксикации отмечалась гиперемия и застойное полнокровие микроциркуляции, особенно в венулах и клубочках, полости которых расширились. Появились единичные мелкие кровоизлияния. В проксимальных и дистальных извитых канальцах коркового вещества отмечалась разная степень повреждения эпителиоцитов. В мозговом веществе также наблюдался застой в микроциркуляции с участками плазморрагии, а среди эпителия канальцев отмечаются единичные дис-

трофичные элементы, но просветы собирательных трубочки были с равномерным кубическим эпителием и свободны. В конце четвертой недели выявленные изменения характеризовались прогрессивным развитием (рисунок). Нефротелий парietального листка клубочка стал слущенным, а состояние большинства ядра мезангиоцитов стало пикнотическим, а также с частичным лизисом, а у нефротелия канальцев, в просвете которых имелись плотные эозинофильные массы, отмечалась десквамация и гиалиново-капельная дистрофия. То есть введение крысам фторида натрия вызывает изменения в почках, характерные для мембранозного интракапиллярного гломерулонефрита.



Морфология почек крыс через один месяц введения фторида натрия в дозе 1,25 мг/кг. Окраска гематоксилин-эозином. х600

Выводы

1. При моделировании хронической фторидной интоксикации ежедневное внутрижелудочное введение крысам линии Вистар фторида натрия в дозе 1,25 мг/кг через одну неделю увеличивает водный и спонтанный диурез в результате повышения клубочковой фильтрации, обусловленного ускорением почечного кровотока. С продолжением интоксикации в конце месяца происходит двукратное снижение водного и спонтанного диуреза вследствие уменьшения скорости почечного кровотока и клубочковой фильтрации, а также повышения объема канальцевой реабсорбции воды. Одновременно снижается экскреция креатинина и повышается его содержание в крови, отмечается протеинурия и гипотензия.

2. Хроническая интоксикация крыс фторидом натрия снижает экскрецию мочевины, а содержание в слоях ткани почек повышает, что увеличивает осмотическое

давление и стимулирует канальцевую реабсорбцию воды.

3. Хроническая интоксикация крыс фторидом натрия способствует развитию в почках застойного полнокровия сосудов интерстиция и клубочков, вызывает дистрофические повреждения эпителиоцитов канальцев почек.

Список литературы

1. Веккер И.Р. Роль факторов окружающей среды в перинатальной патологии // И.Р. Веккер, Н.П. Сетко, Б.Н. Антоненко // Гигиена и санитария. – 2001. – № 3. – С. 29–32.
2. Еналдиева Д.А., Джиоев И.Г., Бибаева Л.В. Функции почек в условиях острой экспериментальной интоксикации фторидом натрия // Владикавказский медико-биологический вестник. – 2011. – Т. XIII, вып. 20. – С. 54–57.
3. Еналдиева Д.А., Караев Т.Р., Джиоев И.Г., Бибаева Л.В. Экспериментальное изучение влияния фтора на водовыделительную функцию почек и почечный кровоток // Вестник международной академии экологии и безопасности жизнедеятельности. – 2010. – Т. 15, № 4. – С. 112–3.
4. Казимирко В.К., Мальцев В.И., Бутылин В.Ю., Горобец Н.И. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия // Морион. – Киев, 2004. – С. 160.

5. Кольман Я., Рем К.Г. Наглядная биохимия: пер. с нем. // Мир. – М., 2000. – С. 469.

6. Маторова Н.И. Формирование здоровья детского населения в промышленных центрах: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.07 // НИИ МТ и ЭЧ Ангарский филиал ВСНЦ СО РАМН. – Иркутск: Б.и, 2003. – 46 с.

7. Маторова Н.И., А.Н. Карчевский, Н.В. Ефимова и др. Особенности функционального состояния детского организма в условиях техногенной нагрузки фтористыми соединениями // Бюллетень ВСНЦ. – 2003. – № 4. – С. 113–116.

8. Zhang Y., Xu W., Ma B., Huang K., Song M., Zhang N., Zhang Y., Wang Y., Dai Y., Luo Y. Isolation and characterisation of a kallikrein-like enzyme from *Agkistrodon halys pallas* snake venom // J Sci Food Agric. – 2011. – Vol. 10. – P. 4733.

5. Kol'man Ya., Rem K.G. Nagladnaya biokhimiya. Moskwa, 2000. pp. 469.

6. Matorova N.I. Formirovanie zdorovia detskogo naselenia v promishlennich centrach: avtoref. dis. doc. med. nauk: 14.00.07 // N.I. Matorova, NII MT I Ech Angarski filial VSNC SO RAMN. Irkutsk 2003, pp. 46.

7. Matorova N.I., Karchevskii A.N., N.V. Efimova I dr. Osobennosti funkcionalnogo sostojania detskogo organizma v usloviah tehnogennoi nagruzki floristymi soedineniami // Bulletin VSNC. 2003. no. 4. pp. 113–116.

8. Zhang Y., Xu W., Ma B., Huang K., Song M., Zhang N., Zhang Y., Wang Y., Dai Y., Luo Y. Isolation and characterisation of a kallikrein-like enzyme from *Agkistrodon halys pallas* snake venom // J Sci Food Agric. 2011. Vol. 10. pp. 4733.

References

1. Vekker I.R. Rol' faktorov okruzhayushei sredi v perinatal'noy patologii // I.R. Vekker, N.P. Setko, B.N. Antonenko // Gigiena i sanitaria. 2001. no. 3. pp. 29–32.

2. Enaldieva D.A., Djioev I.G., Bibaeva L.V. Funkcii pochetk v usloviah ostroi eksperimentalnoi intoksikacii floridom natria // Vladikavkazskii mediko-biologicheskii vestnik. 2011 T. XIII, vip.20. pp. 54–57.

3. Enaldieva D.A., Karaev T.R., Djioev I.G., Bibaeva L.V. Eksperimentalnoe izuchenie vlijania flora na vodovoditelnuju funkciju pochetk i pochetnii krvotok // Vestnik mejdunarodnoi akademii ekologii i bezopasnosti jiznedeiatelnosti. 2010. T.15, no. 4 pp. 112–3.

4. Kazimirko V.K., Malcev V.I., Butilin V.Ju./ Gorobec N.I. Svobodoradikalnoe okislenie I antioksidantnaja terapia // Morion. Kiev, 2004 P. 160 Chlubek D., 1994.

Рецензенты:

Албегова Ж.К., д.м.н., доцент кафедры нормальной физиологии, ГБОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Владикавказ;

Джioев И.Г., д.м.н., профессор, заведующий ЦНИЛ, ГБОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Владикавказ.

Работа поступила в редакцию 02.12.2013.