

УДК 616-092.9: 616.61: 616.447-089.87

## ФУНКЦИОНАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЧЕК И СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПОКАЛЬЦИЕМИЕЙ

<sup>1</sup>Джиоев И.Г., <sup>2</sup>Козаев А.В., <sup>1</sup>Кабоева Б.Н., <sup>1</sup>Козаев Р.Э.

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения России, Владикавказ, e-mail: inal44@mail.ru;

<sup>2</sup>ГБОУ «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения России, Санкт-Петербург

Вследствие чрезвычайной важности кальция для нормальной жизнедеятельности нарушение баланса его содержания в организме человека и животных вызывает различные и значительные патологические изменения. Целью нашей работы было выяснение влияния экспериментальной гипокальциемии на функции и морфологию почек, состояние перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы. Через полтора месяца после оперативного удаления паращитовидных желёз путем их выжигания в почках 21 крыс линии Вистар, у которых развилась стойкая гипокальциемия, наблюдались дистрофические изменения клубочков и эпителия канальцев нефронов с явлениями застойного полнокровия и воспаления. В плазме крови снижается содержание общего кальция, а неорганического фосфора повышается, при этом их экскреции с мочой уменьшаются. Одновременно увеличивается уровень креатинина в крови, а экскреция его с мочой снижается. В результате торможения канальцевой реабсорбции воды повышается спонтанный диурез. Появляется протеинурия. Гипокальциемия усиливает перекисное окисление липидов с повышением содержания гидроперекисей и малонового диальдегида и ослабляет антиоксидантную защиту со снижением активности супероксиддисмутазы и каталазы.

**Ключевые слова:** гипокальциемия, гиперфосфатемия, диурез, экскреция, фильтрация, реабсорбция, протеинурия, каталаза, малоновый диальдегид, супероксиддисмутаза, гидроперекиси

## THE FUNCTIONAL AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISTIC OF KIDNEYS AND CONDITION OF ANTIOXIDANT SYSTEM AT RATS WITH EXPERIMENTAL HYPOCALCAEMIA

<sup>1</sup>Dzhioev I.G., <sup>2</sup>Kozhev A.V., <sup>1</sup>Kaboeva B.N., <sup>1</sup>Kozhev R.E.

<sup>1</sup>North Ossetian State Medical Academy, Vladikavkaz, e-mail: inal44@mail.ru;

<sup>2</sup>North Western State Medical University of I.I. Mechnikov. St. Petersburg

Imbalance of calcium regulating hormones and the calcareous content in a human body and animals causes various pathological changes. The purpose of our work was clarification of influence of experimental hypocalcaemia on functions and morphology of kidneys, condition of peroxidation of lipids and antioxidant system. In one and a half month after quick removal of parathyroid glands by their burning, in kidneys of 21 Wistar rats with persistent hypocalcaemia, were observed dystrophic changes of glomerules and an epithelium of tubules nephrons with the effect of stagnant hyperemia and inflammations. In blood plasma the content of the general calcium decreases and inorganic phosphorus raises, thus their excretion with urine decreases. The content of creatinine in blood increases, and its excretion with urine decreases. As a result of braking of water tubular reabsorption decreases spontaneous diuresis. There is a proteinuria. Hypocaltsiyemiya also causes strengthening of peroxidation of lipids with increase of the content of hydroperoxide and malonic dialdehyde, and weakens antioxidant protection with decrease of activity of superoxide dismutase and catalase.

**Keywords:** hypocalcaemia, hyperfosfatemiya, diuresis, excretion, filtration, reabsorption, proteinuria, catalase, malonic dialdehyde, superoxide dismutase, hydroperoxide

Постоянство внутренней среды организма в ответ на меняющиеся метаболические процессы и условия внешней среды поддерживается различными химическими веществами, среди которых такие как натрий, калий, кальций, фосфор, хлор, водород, кислород, азот являются основными и жизненно необходимыми. Поэтому значительные изменения их содержания как в сторону повышения, так и снижения приводят к серьезным нарушениям здоровья.

Кальций, на долю которого в организме человека приходится около 1,5 кг, нельзя охарактеризовать только словами «очень

важный», так как проще не назвать те процессы, в которых он не принимает участия, чем перечислить все, нормальное течение которых возможно только в присутствии ионов кальция. Отсюда очевидна целесообразность изучения функционирования различных органов и систем в условиях измененного обмена кальция, в частности, при гипер- и гипокальциемии. А среди причин, способных привести к этим патологическим состояниям, могут быть различные заболевания почек, печени, костей, кишечника, изменение содержания паратгормона, кальцитонина, кальцитриола или чувствительности к ним и многое другое [4].

**Целью** работы было выяснение влияния экспериментальной гипокальциемии, создаваемой путем удаления паразитовидных желез, на функции почек, их морфологическую характеристику и состояние перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы.

### Материал и методы исследования

В качестве материала для исследования были взяты биологические пробы (кровь, моча и почки) от 50 лабораторных крыс линии Вистар (20 контрольных и 30 экспериментальных).

Одной из наиболее эффективных моделей, способствующих развитию гипокальциемии, является оперативное удаление паразитовидных желез. Крысам, наркотизированным внутривенным введением золетила (Zoletil, Франция) в дозе 0,1–0,15 мл одной крысе, производили воротничкообразный разрез в области шеи, выделяли щитовидную железу и в ее толще по обе стороны от срединной доли находили (как правило, по две штуки) паразитовидные железы, которые выжигали термокаутером. Выживаемость крыс в первые сутки после операции составляла от 80 до 90%. В дальнейшем гибели крыс не отмечалось. По прошествии 5–6 недель, времени, необходимого для развития гипокальциемии, в случае, если наше оперативное вмешательство оказывалось успешным, у крыс появлялись такие характерные признаки гипокальциемии, как судорожная готовность, выпадение шерсти, катаракта. Но основным критерием гипокальциемии было сниженное содержание кальция в плазме крови, которую брали из хвостовой вены. Из 28 крыс, выживших после паратиреоидэктомии, в эксперимент были взяты только 21, у которых концентрация кальция в плазме крови была  $1,72 \pm 0,18$  ммоль/л, а у оставшихся 7-и крыс –  $2,18 \pm 0,16$  ммоль/л, что было близко к результатам интактных крыс контрольной группы ( $2,32 \pm 0,19$  ммоль/л), поэтому они не были взяты в опыт. Все животные на протяжении всего эксперимента имели свободный доступ к воде и пище, который соответствовал стандартному рациону, освещенные вивария было приближено к затемненному, как естественному для грызунов.

При проведении опытов крыс на шесть часов помещали в специальные клетки-воронки для сбора мочи, в которой спектрофотометрически определяли содержание эндогенного креатинина (метод Поппера), общего белка (метод Лоури), кальция и фосфора с помощью эриохрома синего и молибденовокислого аммония [9]. По общепринятым формулам [8] рассчитывали: диурез, скорость клубочковой фильтрации и объём канальцевой реабсорбции воды, фильтрационный заряд, канальцевую реабсорбцию и экскрецию с мочой кальция и фосфора. В плазме крови крыс, декапитированных при завершении опытов, определяли содержание креатинина, общего белка (биуретовый метод), кальция и фосфора, гидроперекисей, а в эритроцитах – малонового диальдегида [6], активность каталазы и супероксиддисмутазы [2].

Полученные результаты статистически обрабатывались с помощью компьютерной программы «GraphPad Prism 5.03», а степень достоверности используемого параметрического метода сравнения оценивалась по t-критерию Стьюдента.

Почки крыс после соответствующей подготовки с последующей окраской срезов гематоксилин-эозином изучались морфологически с помощью световой микроскопии.

### Результаты исследования и их обсуждение

Через полтора месяца после паратиреоидэктомии спонтанный диурез у экспериментальных крыс достоверно ( $p < 0,001$ ) повысился с  $0,19 \pm 0,01$  мл/ч/100 г до  $0,27 \pm 0,012$  мл/ч/100 г, что было обусловлено снижением ( $p < 0,001$ ) канальцевой реабсорбции воды ( $98,88 \pm 0,07\%$  – контроль,  $98,06 \pm 0,09\%$  – опыт,  $p < 0,002$ ), так как скорость клубочковой фильтрации особо не изменилась ( $12,83 \pm 0,94$  мл/ч/100 г – контроль,  $14,08 \pm 1,12$  мл/ч/100 г – опыт).

Исследование содержания креатинина в плазме крови как одного из показателей нормальной работы почек выявило его достоверное ( $p < 0,002$ ) повышение у гипокальциемических крыс с контрольного уровня интактных крыс в  $72,64 \pm 2,28$  мкмоль/л до  $84,64 \pm 2,94$  мкмоль/л через полтора месяца после удаления паразитовидных желез.

Изменение водовыделительной функции почек сопровождалось значительной протеинурией ( $8,35 \pm 0,58$  мкг/мл – контроль,  $19,82 \pm 0,84$  мкг/мл – опыт,  $p < 0,001$ ). Очевидно, что такая потеря белка с мочой, превосходящая норму в 2,4 раза, способствовала тому, что его содержание в плазме крови начало уменьшаться ( $64,09 \pm 2,31$  г/л – контроль,  $58,77 \pm 1,98$  г/л – опыт).

Концентрация общего кальция в плазме крови опытных крыс в  $1,79 \pm 0,15$  ммоль/л по сравнению с нормой в  $2,32 \pm 0,19$  ммоль/л было меньше на 34,8% ( $p < 0,05$ ), что для такого относительно постоянного показателя как уровень кальция в крови – значительное уменьшение [5, 10]. Изучение обработки кальция в почках выявило снижение ( $p < 0,001$ ) фильтрационного заряда с контрольной величины в  $24,42 \pm 1,58$  мкмоль/ч/100 г до  $14,34 \pm 1,08$  мкмоль/ч/100 г, что при уменьшении скорости клубочковой фильтрации и содержания кальция в крови является закономерным. Но, несмотря на снижение количества кальция, профильтровавшегося в клубочках нефронов, в результате того, что одновременно тормозилось его обратное всасывание в канальцах почек ( $p < 0,001$ ), экскреция кальция с мочой у гипокальциемических крыс повысилась ( $0,55 \pm 0,027$  мкмоль/ч/100 г – контроль;  $0,64 \pm 0,03$  мкмоль/ч/100 г – опыт,  $p < 0,05$ ).

Обмен кальция в организме человека и млекопитающих нельзя рассматривать отдельно без обмена фосфора, и из

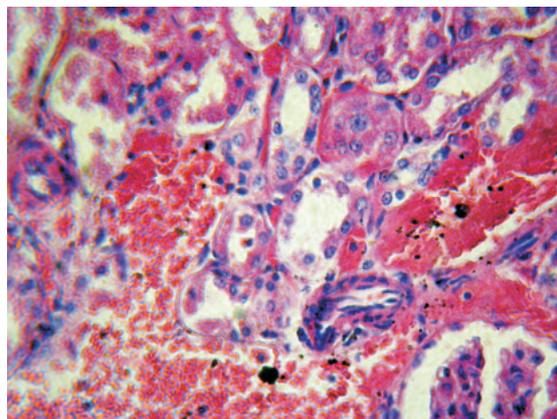
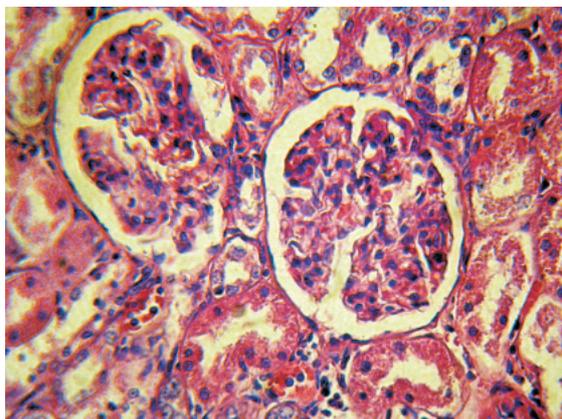
98% кальция костей, 85% приходится на ортофосфат  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Если удаление паращитовидных желез привело к гипокальциемии, то в отношении неорганического фосфора, наоборот, произошло повышение ( $p < 0,002$ ) его уровня в плазме крови с  $1,36 \pm 0,09$  ммоль/л (контроль) до  $1,94 \pm 0,14$  ммоль/л (опыт), и вместе с тем изменилась его экскреция с мочой. Хотя фильтрационный заряд фосфора, несмотря на снижение клубочковой фильтрации, но в результате гиперфосфатемии, не изменился ( $17,52 \pm 1,36$  мкмоль/ч/100 г – контроль,  $18,97 \pm 1,54$  мкмоль/ч/100 г – опыт). Но так как канальцевая реабсорбция фосфора с контрольного уровня в  $95,07 \pm 0,35\%$  достоверно ( $p < 0,01$ ) повысилась до  $96,59 \pm 0,42\%$ , то его экскреция соразмерно ( $p < 0,01$ ) снизилась ( $0,87 \pm 0,03$  мкмоль/ч/100 г – контроль,  $0,65 \pm 0,03$  мкмоль/ч/100 г – опыт).

Отмеченное повышение содержания фосфора в плазме крови в свою очередь способствует усилению гипокальциемии, а низкий уровень паратгормона, который должен быть после удаления паращитовидных желез, снизит активность 1-гидроксилазы, фермента, превращающего 25-гидроксивитамин D в его активную форму –  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  или кальцитриол, и поэтому произойдет уменьшение всасывания кальция из кишечника, что усилит гипокальциемию [1].

Изучение влияния гипокальциемии на перекисного окисления полиненасы-

щенных жирных кислот, о котором мы судили по содержанию в плазме крови гидроперекисей и малонового диальдегида в эритроцитах, выявило усиление окислительной деградации липидов, и уровень гидроперекисей с контрольной величины в  $4,66 \pm 0,21$  мкмоль/л повысился до  $7,63 \pm 0,42$  мкмоль/л (на 63,7%,  $p < 0,001$ ). Достоверно ( $p < 0,01$ ) увеличилось и содержание малонового диальдегида с  $32,45 \pm 2,28$  мкмоль/л (контроль) до  $47,63 \pm 2,68$  мкмоль/л (опыт), но в процентном отношении по сравнению с гидроперекисями оно было в меньшей степени (на 46,8%). Одновременно с усилением перекисидации липидов снижение содержания кальция в плазме крови на антиоксидантную защиту клеток оказало ослабляющее действие, и активность супероксиддисмутазы (контроль –  $68,84 \pm 2,49$  ед. ингибир., опыт –  $50,81 \pm 2,67$  ед. ингибир.,  $p < 0,001$ ) и каталазы (контроль –  $7,18 \pm 0,29 \cdot 10^{-4}$  МЕ/г Нб, опыт –  $4,71 \pm 0,25 \cdot 10^{-4}$  МЕ/г Нб,  $p < 0,001$ ) были снижены.

Полученные нами результаты состояния перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты аналогичны изменения, отмеченным у подростков с эссенциальной артериальной гипертензией и сниженным содержанием общего кальция в крови [7], а также у беременных с поздним гестозом и гипокальциемией [3]. При этом применение аскорбиновой кислоты и витамина  $\text{D}_3$  уменьшает степень накопления продуктов перекисидации.



*Морфология почек крыс через полтора месяца после паратиреоидэктомии. Окраска гематоксилин-эозином. х600*

Морфологическое исследование почек у крыс с гипокальциемией выявило увеличение клубочков, имеющих разную степень расширения полости, с накоплением депозитов и отеком мезангия. Эпителий канальцев коркового вещества имел дистрофические изменения с апикальной деструкцией и частичным пикнозом ядер, а в отдельных

участках с явлениями кариолизиса. Просвет канальцев местами был расширен и заполнен десквамациями. В периваскулярных пространствах отмечались очаговые воспалительные инфильтраты. В канальцах мозгового вещества почек также имелись разнообразные дистрофические изменения, с расширением просвета и накоплением

ями в них аморфных и плотных гиалиновых масс. В интерстициальном пространстве наряду с дистрофическими изменениями отмечались воспалительные инфильтраты и застойное полнокровие в сосудистой системе.

Таким образом, удаление паразитовидных желёз у крыс линии Вистар вызывает: гипокальциемию и гипокальциуриез; гиперфосфатемию и гипофосфатуриез; протеинурию; увеличение содержания креатинина в плазме крови; повышение спонтанного диуреза в результате уменьшения канальцевой реабсорбции воды; усиление перекисного окисления липидов и ослабление антиоксидантной защиты; дистрофические изменения клубочков и эпителия канальцев нефронов, с застойными и воспалительными явлениями.

### Список литературы

1. Васильева Т.Г., Кочеткова Е.А. Особенности обмена кальция и фосфора у детей раннего возраста // Вестник Дальневосточного отделения РАН. – 2006. – № 2. – С. 91–96.
2. Данилова Л.А. Справочник по лабораторным методам исследования / под ред. Л.А. Даниловой. – СПб.: Питер, 2003. – 736 с.
3. Данилова Н.Р. Некоторые особенности метаболических нарушений в крови беременных с поздним гестозом и их коррекция: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Краснодар, 2009. – 25 с.
4. Гайтон А.К., Холл Дж.Э. Медицинская физиология. – М.: Логосфера, 2008. – 1256 с.
5. Лейкок Дж.Ф., Вайс П.Г. Основы эндокринологии. – М.: Медицина, 2000. – 502 с.
6. Камышников В.С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика. – Минск: Интерпрессервис. – 2003. – Т. 2. – 463 с.
7. Колесникова, Л.И. Особенности состояния системы «перекисного окисления липидов – антиоксидантной защиты» и обмена кальция у детей подросткового возраста при эссенциальной артериальной гипертензии / Л.И. Колесникова, В.В. Долгих, Ж.В. Прохорова и др. // Педиатрия. – 2010. – Т. 89, № 3. – С. 10–14.
8. Наточин Ю.В. Физиология почки. Формулы и расчёты. – Л.: Наука, 1971. – 59 с.

9. Рябов С.И., Наточин Ю.В., Бондаренко Б.Б. Диагностика болезней почек. – Л.: Медицина, 1979. – 254 с.
10. Ткаченко Б.И. Нормальная физиология человека. – М.: Медицина, 2005. – 927 с.

### References

1. Vasil'eva, T.G. Kochetkova E.A. Osobennosti obmena kal'cija i fosfora u detej rannego vozrasta. Vestnik Dal'nevostochnogo otdelenija RAN, 2006, no. 2, pp. 91–96.
2. Danilova L.A. Spravochnik po laboratornym metodam issledovanija. Pod red. L.A. Danilovoj. S.-Pb.: Piter, 2003, 736 p.
3. Danilova N.R. Nekotorye osobennosti metabolicheskikh narushenij v krovi beremennyh s pozdnim gestozom i ih korrekciya. Avtoref. kand. med. nauk, Krasnodar, 2009, 25 p.
4. Gajton A.K., Holl Dzh.Je. Medicinskaja fiziologija. M.: Logosfera, 2008, 1256 p.
5. Lejkok Dzh.F., Vajs P.G. Osnovy jendokrinologii. M.: Medicina, 2000, 502 p.
6. Kamyshnikov V.S. Kliniko-biohimicheskaja laboratornaja diagnostika. Mn.: Interpresservis, 2003, vol. 2, 463 p.
7. Kolesnikova, L.I., Dolgih V.V., Prohorova Zh.V. i dr. Osobennosti sostojanija sistemy «perekisnogo okislenija lipidov – antioksidantnoj zashhity» i obmena kal'cija u detej podrostkovogo vozrasta pri jessencial'noj arterial'noj gipertenzii. Peditrija, 2010, vol. 89, no. 3, pp. 10–14.
8. Natochin Ju.V. Fiziologija pochki. Formuly i raschjoty. L.: Nauka, 1971, 59 p.
9. Rjabov S.I., Natochin Ju.V., Bondarenko B.B. Diagnostika boleznej pochek. L.: Medicina, 1979, 254 p.
10. Tkachenko B.I. Normal'naja fiziologija cheloveka. M.: Medicina, 2005, 927 p.

### Рецензенты:

Бибаева Л.В., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой биологии и гистологии ГБОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия Минздрава России». г. Владикавказ;

Урумова Л.Т., д.м.н., доцент кафедры патологической физиологии, ГБОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия Минздрава России», г. Владикавказ.

Работа поступила в редакцию 18.06.2013.