

УДК 616.092-09; 616.61-002; 612.447

МЕХАНИЗМЫ ВОДОВОДЕЛИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ ПОЧЕК ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОСТРОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ НА ФОНЕ ГИПЕРКАЛЬЦИЕМИИ

¹Джиоев И.Г., ¹Козаев А.В., ¹Кабоева Б.Н., ^{1,2}Батагова Ф.Э.

¹Северо-Осетинская государственная медицинская академия, Владикавказ, e-mail: inal44@mail.ru;

²Институт биомедицинских исследований Владикавказского научного центра РАН и Правительства Республики Северная Осетия-Алания, Владикавказ

Введение крысам линии Вистар глицерина в дозе 0,8 мл/100 г вызывает токсическое поражение почек с протеинурией, снижением спонтанного диуреза в результате уменьшения клубочковой фильтрации, в основе которой лежит торможение объемной скорости почечного кровотока. Экспериментальная гиперкальциемия, вызванная ежедневным в течение двух недель, введением крысам витамина D в дозе 10 000 МЕ/100 г также вызывает протеинурию, снижение объемной скорости почечного кровотока, клубочковой фильтрации, усиление канальцевой реабсорбции воды и торможение спонтанного диуреза. А при совместном введении глицерина и витамина D все отмеченные изменения становятся менее выраженными. Количество эритроцитов и содержание гемоглобина при токсическом поражении почек снижается, а при гиперкальциемии – повышается, при одновременном введении остаются в пределах нормы. Как при токсическом поражении почек, так и при гипервитаминозе D усиливается пероксидация липидов и ослабление антиоксидантной защиты, не меняющаяся при их сочетании.

Ключевые слова: токсическое поражение почек, гипервитаминоз D, протеинурия, снижение диуреза, пероксидация, антиоксидантная система, эритроциты, гемоглобин

MECHANISMS OF WATER-EXCRETORY RENAL FUNCTION IN EXPERIMENTAL ACUTE RENAL FAILURE AGAINST THE BACKGROUND OF HYPERCALCEMIA

¹Dzhioev I.G., ¹Kozaev A.V., ¹Kaboeva B.N., ^{1,2}Batagova F.E.

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

²Institute of Biomedical Research of Vladikavkaz scientific center of the Russian Academy of Sciences and Government of the Republic of North Ossetia-Alania, Vladikavkaz

Introduction of glycerin in a dose of 0,8 ml/100 g to Wistar rats causes toxic damage of kidneys with a proteinuria, decrease in spontaneous diuresis as a result of reduction of a glomerular filtration which is based on the inhibition of renal blood flow volume rate. Experimental hypercalcemia caused by introduction to rats of vitamin D in a dose 10 000 ME/100 g daily within two weeks also causes a proteinuria, renal blood flow volume rate, glomerular filtration, strengthening of tubular reabsorption of water and inhibition of spontaneous diuresis. And at combined introduction of glycerin and vitamin D all noted changes become less expressed. The quantity of erythrocytes and the content of hemoglobin, at toxic damage of kidneys decreases, and at a hypercalcemia – increases, at simultaneous introduction remain within norm. Both at toxic damage of kidneys, and at a hypercalcemia the peroxidation of lipids and weakening of antioxidant protection which isn't changing at their combination amplifies.

Keywords: toxic nephritis, hypervitaminosis D, proteinuria, decreased urine output, peroxidation, antioxidant system, erythrocytes, hemoglobin

То, что функции почек многогранны и чрезвычайно важны для нормальной жизнедеятельности – факт неоспорим и кроме, так сказать чисто почечных функций (водо-, и ионорегулирующей), они выполняют и другие, в частности еще и инкреторную функцию. И это не только ренин, приводящий к образованию ангиотензина II, но и урокиназа, и простагландины, и брадикинин, но и эритропоэтины и кальцитриол с регуляцией эритропоэза и обмена кальция [1, 5]. И именно с этой точки зрения мы проводили работу, создавая по отдельности и вместе токсическое поражение почек и гиперкальциемию. А с учетом того, что в почках интенсивно протекают аэробные процессы, то необходимо еще посмотреть состояние антиоксидантной защиты, что в условиях повышен-

ного содержания кальция в крови может протекать несколько по-иному [8].

Целью настоящего исследования было выяснение механизмов функционального состояния почек в условиях их экспериментального острого токсического поражения на фоне гиперкальциемии, созданной гипервитаминозом D.

Материалы и методы исследования

Для решения поставленной цели последовательно решались три задачи. Первая, создание на 30-и крысах линии Вистар, после суточного лишения их пищи и воды, токсической почечной недостаточности по G. Greven путем внутримышечного введения 50,0% глицерина в дозе 0,8 мл/100 г, которую делили пополам и вводили в задние лапы, что уменьшало гибель животных после инъекции [2]. Опыты на них проводили на 7-й и 14-й дни после введения нефротоксиканта.

Вторая задача – создание на 30-и крысах линии Вистар модели гиперкальциемии путем ежедневного, в течение 14 дней, введения через зонд в желудок витамина D (Аквадетрим) в дозе 10 000 МЕ/100 г вместе с 1,5 мл водопроводной воды, что позволяет полностью ввести препарат и одновременно избежать гидратации, чтобы не происходило вымывание и уменьшение эффекта витамина D. Опыты на крысах, получавших витамин D, были поставлены после семи и четырнадцати введений.

И третья задача – создание на 30-и крысах линии Вистар сочетанного экспериментального токсического поражения почек и одновременного введения витамина D. И в этом варианте опыты также ставили после семи и четырнадцати введений витамина D и на 7-й и 14-й дни после введения крысам глицерина (в первый день вводили только витамин, а глицерин во второй), что позволило создать одинаковые условия проведения экспериментов для корректного их сопоставления.

В качестве контроля были взяты 15 интактных крыс. Животные всех групп на протяжении всего эксперимента имели свободный доступ к пище и воде, которая за 30–40 минут до начала опытов убиралась из клеток. Световой режим соответствовал естественному для животных ночного образа жизни (затемненный).

Во всех сериях у крыс изучали функциональное состояние почек (водовыделительная функция, степень протеинурии); картину крови (количество эритроцитов и содержание гемоглобина); состояние перекисного окисления липидов (содержание гидроперекисей и малонового диальдегида) и антиоксидантную защиту (активность каталазы и супероксиддисмутазы).

О водовыделительной функции судили по количеству мочи, выделившейся за шесть часов, с последующим расчетом спонтанного диуреза и скорости клубочковой фильтрации (мл/час/100 г), объема канальцевой реабсорбции воды (%), для чего в моче и плазме крови методом Поппера определяли содержание эндогенного креатинина (мкмоль/л) [4], а для выяснения возможных механизмов клубочковой фильтрации инвазивным способом определяли объемную скорость (мл/мин) почечного кровотока (ультразвуковой флуометр Transonic NT313, США). Степень протеинурии (мг/мл) и содержание общего белка в плазме крови (г/л) определяли методом Лоури и биуретовым [6]. Концентрацию кальция в плазме крови (ммоль/л) определяли спектрофотометрически с помощью эриохрома синего. Количество эритроцитов в крови определяли с помощью гематологического анализатора (Egma, Япония), уровень гемоглобина – спектрофотометрически гемиглобинцианидным методом. Содержание гидроперекисей в плазме крови, малонового диальдегида в эритроцитах, активность каталазы и супероксиддисмутазы в эритроцитах определяли спектрофотометрически [4, 6]. У крыс после предварительного внутрибрюшинного введения анестетика общего действия «Золетил» в дозе 0,1 мл/100 г и в состоянии обезболивания и сна определяли почечный кровоток, а затем из сердца отбирали кровь для исследований.

Полученные результаты статистически обрабатывались с помощью компьютерной программы «GraphPad Prizm 5.04», степень достоверности оценивалась по t-критерию Стьюдента (параметрический метод сравнения средних величин).

Результаты исследования и их обсуждение

Введение крысам глицерина вызвало снижение спонтанного диуреза на 26,4% ($p < 0,02$) через одну неделю и на 48,6% ($p < 0,001$) через две (табл. 1) в результате уменьшения скорости клубочковой фильтрации с величины $12,83 \pm 0,94$ мл/час/100 г до $10,16 \pm 0,72$ мл/час/100 г (первая неделя, $p < 0,05$) и до $7,25 \pm 0,46$ мл/час/100 г в конце второй недели ($p < 0,001$). В это же время отмечалось снижение объемной скорости почечного кровотока с $10,24 \pm 0,68$ мл/мин (контроль) до $6,94 \pm 0,52$ мл/мин ($p < 0,002$), что очевидно и способствовало ослаблению гломерулярной фильтрации. Одновременно в плазме крови статистически значимо ($p < 0,01$) повышался уровень креатинина ($72,64 \pm 2,28$ мкмоль/л – контроль и $84,25 \pm 3,23$ мкмоль/л через две недели после введения глицерина), а в моче появилась протеинурия, особенно в конце второй недели, превосходя контроль в 2,4 раза (табл. 1). И вместе с ней в содержании общего белка в плазме крови наметилась тенденция к снижению ($64,09 \pm 2,31$ г/л – контроль, $61,32 \pm 2,28$ г/л и $60,12 \pm 2,45$ г/л через одну и две недели после введения глицерина).

Создание гиперкальциемии (содержание кальция в плазме крови у контрольных крыс $2,32 \pm 0,17$ ммоль/л, $2,95 \pm 0,21$ ммоль/л ($p < 0,05$) и $3,24 \pm 0,28$ ммоль/л ($p < 0,002$) через одну и две недели введения витамина D) на водовыделительную функцию почек выявило тормозящее влияние на спонтанный диурез, который в недельных опытах уменьшился на 21,1% ($p < 0,05$), а в двухнедельных – на 52,6% ($p < 0,01$). При этом сначала это было обусловлено усилением ($p < 0,02$) обратного всасывания воды в канальцах почек (табл. 1), а затем, при остающейся на прежнем повышенном уровне канальцевой реабсорбции воды, еще и снижением на 25,4% процесса фильтрации воды в клубочках почек (табл. 1). Поэтому снижение спонтанного диуреза в конце второй недели приема витамина D было столь значительным. Отмеченное снижение скорости клубочковой фильтрации при завершении опытов, очевидно, было обусловлено уменьшением объемной скорости почечного кровотока, которая у контрольных крыс была $11,48 \pm 0,72$ мл/мин, а у экспериментальных – $7,26 \pm 0,68$ мл/мин ($p < 0,002$), а при недельном введении аквадетрима особых изменений почечного кровотока ($12,08 \pm 1,18$ мл/мин) не отмечалось.

В моче как в конце первой, так и второй недели определялась протеинурия, которая превышала величину контроля в 1,6 и в 2,1 раза соответственно

(табл. 1). Практически без изменений оставался уровень общего белка в плазме крови ($62,46 \pm 2,18$ г/л – контроль, $60,74 \pm 2,88$ г/л – после недельного и $59,12 \pm 3,35$ г/л – двухнедельного введения витамина D).

При одновременном создании токсического поражения почек и создания гипервитаминоза D изменения спонтанного диуреза и основных процессов мочеобразования не имели статистически значимого отличия как от данных, полученных у крыс после введения им глицерина, так и результатов гипервитаминозных (табл. 1).

Изучение состояния перекисного окисления липидов и активность антиоксидантной защиты показали, что через одну неделю после введения крысам глицерина отмечалось усиление как перекисидации липидов, так и антиоксидантной защиты (табл. 2), но к концу второй недели начала преобладать окислительная деградация липидов, что привело к повышению содержания гидроперекисей ($p < 0,001$) и малонового диальдегида ($p < 0,01$), а активность супероксиддисмутазы ослабла ($p < 0,01$). Реакция снижения активности каталазы не носила статистически значимого отличия (табл. 2).

Таблица 1

Спонтанный диурез, скорость клубочковой фильтрации, объем канальцевой реабсорбции воды и протеинурия у крыс при остром токсическом поражении почек, двухнедельном введении витамина D и при их сочетании

Условия опытов	Стат. показат.	Диурез (мл/час/100г)	Клубочковая фильтрация (мл/час/100г)	Канальцевая реабсорбция (%)	Протеинурия (мкг/мл)
Интактные (контроль)	$M \pm m$	$0,19 \pm 0,01$	$12,83 \pm 0,94$	$98,88 \pm 0,07$	$6,35 \pm 0,58$
После введении глицерина					
на 7-й день	$M \pm m$	$0,14 \pm 0,015$	$10,16 \pm 0,72$	$98,62 \pm 0,14$	$11,12 \pm 0,98$
	$p_{\text{инт}}$	$< 0,02$	$< 0,05$		$< 0,05$
на 14-й день	$M \pm m$	$0,12 \pm 0,009$	$7,25 \pm 0,46$	$98,67 \pm 0,12$	$20,04 \pm 1,86$
	$p_{\text{инт}}$	$< 0,001$	$< 0,001$		$< 0,001$
После введения витамина					
7 раз	$M \pm m$	$0,15 \pm 0,012$	$15,69 \pm 1,68$	$99,15 \pm 0,06$	$9,48 \pm 0,83$
	$p_{\text{инт}}$	$< 0,02$		$< 0,02$	$< 0,02$
14 раз	$M \pm m$	$0,09 \pm 0,008$	$10,26 \pm 0,64$	$99,21 \pm 0,08$	$12,52 \pm 1,06$
	$p_{\text{инт}}$	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,01$	$< 0,001$
При совместном введении глицерина и витамина D					
на 7-й день и витамина 7 раз	$M \pm m$	$0,17 \pm 0,02$	$13,46 \pm 1,45$	$98,65 \pm 0,15$	$8,56 \pm 0,61$
	$p_{\text{инт}}$	*	*	*	$< 0,05$
	$P_{\text{глиц.}} / P_{\text{вит.}}$	* // *	* // *	* // *	* // *
на 14-й день и витамина 7 раз	$M \pm m$	$0,12 \pm 0,02$	$12,26 \pm 1,32$	$99,02 \pm 0,11$	$16,62 \pm 1,26$
	$p_{\text{инт}}$	$< 0,01$	*	*	$< 0,001$
	$P_{\text{глиц.}} / P_{\text{вит.}}$	* // *	* // *	* // *	* // *

Пр и м е ч а н и е . * – отсутствие статистически значимых отличий.

Таблица 2

Показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты у крыс при остром токсическом поражении почек, двухнедельном введении витамина D и при их сочетании

Условия опытов	Стат. показат.	Гидроперекиси (мкмоль/л)	Малоновый диальдегид (мкмоль/л)	Супероксиддисмутазы (ед. ингибир.)	Каталаза ($\times 10^{-4}$ МЕ/г Hb)
1	2	3	4	5	6
Интактные (контроль)	$M \pm m$	$4,66 \pm 0,21$	$32,45 \pm 2,28$	$68,84 \pm 2,49$	$7,18 \pm 0,29$
После введении глицерина					
на 7-й день	$M \pm m$	$5,64 \pm 0,37$	$41,62 \pm 3,16$	$79,26 \pm 3,89$	$8,61 \pm 0,44$
	$p_{\text{инт}}$	$< 0,05$	$< 0,05$	$< 0,05$	$< 0,02$

Окончание табл. 2					
1	2	3	4	5	6
на 14-й день	M ± m	6,54 ± 0,35	44,58 ± 2,55	57,25 ± 2,76	6,21 ± 0,34
	p _{инт.}	< 0,001	< 0,001	< 0,01	< 0,05
После введения витамина					
7 раз	M ± m	7,89 ± 0,41	47,05 ± 3,24	80,16 ± 3,55	7,64 ± 0,47
	p _{инт.}	< 0,001	< 0,001	< 0,02	*
14 раз	M ± m	9,16 ± 0,38	56,28 ± 4,12	65,12 ± 2,96	5,84 ± 0,86
	p _{инт.}	< 0,001	< 0,001	*	*
При совместном введении глицерина и витамина D					
на 7-й день	M ± m	6,78 ± 0,54	43,63 ± 3,82	76,58 ± 5,22	6,89 ± 0,41
	p _{инт.}	< 0,01	< 0,05	*	*
	P _{глиц.} / P _{вит.}	* // *	* // *	* // *	* // *
на 14-й день	M ± m	7,57 ± 0,63	53,76 ± 4,08	71,33 ± 4,25	6,25 ± 0,57
	p _{инт.}	< 0,001	< 0,02	*	*
	P _{глиц.} / P _{вит.}	* // *	* // *	* // *	* // *

Примечание. * – отсутствие статистически значимых отличий.

В условиях недельного гипервитаминоза отмечалось повышение пероксидации липидов, которое в конце второй недели стало еще значительней (табл. 2), особенно гидроперекисей как первичных промежуточных липидных радикалов. Активность же ферментов антиоксидантной защиты одновременно начала снижаться (табл. 2).

Создание токсического поражения почек с одновременным развитием гиперкальциемии не привнесло каких-либо изменений исследуемых показателей перекисного окисления липидов и ферментов антиоксидантной защиты.

Изучение количества эритроцитов и содержание гемоглобина, которые у контрольных крыс были $5,87 \pm 0,45 \cdot 10^{12}/л$ и $133,28 \pm 2,37$ г/л соответственно, показало, что у крыс с токсическим поражением почек через одну неделю они снизились на 8,6% и 12,5%, но статистически значимое отличие эти показатели приобрели спустя одну неделю, когда количество эритроцитов стало $4,96 \pm 0,39 \cdot 10^{12}/л$ ($p < 0,02$), а содержание гемоглобина – $105,4 \pm 2,33$ г/л ($p < 0,002$); у крыс, получавших витамин D, наоборот, отмечалось повышение на 7,6% и % 7,4% (через одну неделю), а в конце второй недели повышение уже имело статистически значимые величины до $7,25 \pm 0,5 \cdot 10^{12}/л$ ($p < 0,02$) и $149,35 \pm 3,73$ г/л ($p < 0,002$); у крыс третьей экспериментальной группы на протяжении двух недель не отмечалось каких-нибудь существенных изменений, а полученные результаты оставались в пределах статистических колебаний. Отмечен-

ные изменения очевидно обусловлены тем, что у крыс с токсическим поражением почек, возможно, являлись следствием сниженной выработки эритропоэтина в почках, а при введении витамина в результате его стимулирующего влияния на эритропоэз и соответственно уравнивание этих двух процессов [3, 7, 8].

Список литературы

1. Гайтон А.К., Холл Дж.Э. Медицинская физиология / Пер. с англ. – М.: Логосфера, 2008. – 1296 с.
2. Джиоев И.Г., Фидарова А.М. Некоторые особенности функции и морфологии почек в условиях различных моделей экспериментальной почечной недостаточности // Вестник новых медицинских технологий. – 2008. – Т. XV, № 1. – С. 38–39.
3. Джиоев И.Г., Козаев А.В., Кабоева Б.Н., Караева Д.А. Влияние экспериментальной гиперкальциемии на показатели крови, перекисное окисление липидов и водо-выделительную функцию почек // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 6. URL: <http://www.science-education.ru/113-11825>.
4. Камышников В.С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика. – Мн.: Интерпрессервис. – 2003. – Т. 2. – 463 с.
5. Современный курс классической физиологии / под редакцией Ю.В. Наточина. – М.: «ГОЭТАР-Медиа», 2007. – 382 с.
6. Справочник по лабораторным методам исследования / Под ред. Л.А. Даниловой. – СПб.: Питер, 2003. – 736 с.
7. Golbahar J., Altayab D., Carreon E., Darwish A. Association of vitamin D deficiency and hyperparathyroidism with anemia: a cross-sectional study // J. of Blood Medicine. – 2013. – № 4. – P. 123–128.
8. Kendrick J., Targher G., Smits G., Chonchol M. 25-Hydroxyvitamin D deficiency and inflammation and their association with hemoglobin levels in chronic kidney disease // Am J Nephrol. – 2009. – Vol. 30, № 1. – P. 64–72.

References

1. Gajton A.K., Holl Dzh.Je. Medicinskaja fiziologija / Per. s angl. M.: Logosfera, 2008. 1296 p.

2. Dzhioev I.G., Fidarova A.M. Nekotorye osobennosti funktsii i morfologii pochek v usloviyah razlichnykh modelej jeksperimental'noj pochechnoj nedostatochnosti // Vestnik novykh medicinskih tehnologij. 2008. T. XV, no. 1. pp. 38–39.

3. Dzhioev I.G., Kozaev A.V., Kaboeva B.N., Karaeva D.A. Vliyanie jeksperimental'noj giperkal'tsemii na pokazateli krovi, perekisnoe okislenie lipidov i vodovydritel'nyju funktsiju pochek // Sovremennye problemy nauki i obrazovanija. 2013. no. 6. URL: <http://www.science-education.ru/113-11825>.

4. Kamyshnikov V.S. Kliniko-biohimicheskaja laboratornaja diagnostika. Mn.: Interpresservis. 2003. T. 2. 463 p.

5. Sovremennyy kurs klassicheskoj fiziologii /pod redakciej Ju.V. Natochina. M.: «GOJeTAR-Media», 2007. 382 p.

6. Spravochnik po laboratornym metodam issledovanija / Pod red. L.A. Danilovoj. SPb.: Piter, 2003. 736 p.

7. Golbahar J., Altayab D., Carreon E., Darwish A. Association of vitamin D deficiency and hyperparathyroidism with anemia: a cross-sectional study // J. of Blood Medicine. 2013. no. 4. pp. 123–128.

8. Kendrick J., Targher G., Smits G., Chonchol M. 25-Hydroxyvitamin D deficiency and inflammation and their association with hemoglobin levels in chronic kidney disease // Am J Nephrol. 2009. Vol. 30, no. 1. pp. 64–72.

Рецензенты:

Брин В.Б., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии ГБОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Владикавказ;

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

Работа поступила в редакцию 30.12.2014.