

УДК 616-091.0; 616-092.0

ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРКАЛЬЦИЕМИИ НА ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ, ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И ВОДОВЫДЕЛИТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ ПОЧЕК

¹Козаев А.В., ¹Джиоев И.Г., ¹Кабоева Б.Н., ¹Караева Д.А.

¹Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Владикавказ, Россия (362019, г. Владикавказ, ул. Пушкинская, 40), e-mail: inal44@mail.ru

В силу чрезвычайной важности для нормальной жизнедеятельности кальция изучение различных нарушений его гомеостаза остается актуальным, поэтому целью работы было экспериментальное исследование влияния гиперкальциемии, созданной пероральным ежедневным введением крысам линии Вистар витамина D (Аквдетрим) в дозе 10 000 МЕ/100 г в течение двух недель, на показатели крови, функции почек, состояние перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы. Проведенные исследования выявили повышение в крови содержания кальция и неорганического фосфора, креатинина и мочевины, количества эритроцитов и гемоглобина; усилилась пероксидация липидов с повышением содержания гидроперекисей и малонового диальдегида и ослабла антиоксидантная защита со снижением активности супероксиддисмутазы и каталазы. Уровень общего белка в плазме крови не менялся. Недельное введение аквдетрима снизило спонтанный диурез за счет усиления канальцевой реабсорбции воды, а двухнедельный гипervитаминоз D – еще и за счет снижения скорости клубочковой фильтрации.

Ключевые слова: гипervитаминоз D, аквдетрим, гиперкальциемия, эритроцитоз, диурез, фильтрация, реабсорбция, протеинурия, гидроперекиси, малоновый диальдегид, супероксиддисмутазы, каталаза.

THE INFLUENCE OF EXPERIMENTAL HYPERCALCEMIA ON BLOOD INDICATORS, PEROXIDATION OF LIPIDS AND WATER SECRETORY FUNCTION OF KIDNEYS

¹Kozaev A.V., ¹Dzhioev I.G., ¹Kaboeva B.N., ¹Karaeva D.A.

¹North Ossetian State Medical Academy, Vladikavkaz, Russia (362019, Vladikavkaz, street Pushkinskaya, 40)

Owing to extreme importance for normal vital functions of calcium, studying of various violations of its homeostasis remains urgent therefore the purpose of influence of hypercalcemia created by daily peroral introduction to Vistar rats of vitamin D (Akvadetrin) in a dose of 10 000 IU/100g within two weeks, on indicators of blood, function of kidneys, condition of peroxidation of lipids and antioxidant system. The conducted researches revealed increase in blood of the content of calcium and inorganic phosphorus, creatinine and urea, quantity of erythrocytes and hemoglobin, the peroxidation of lipids with increase of contents of hydroperoxides and malondialdehyde amplified and antioxidant protection has weakened with decrease in activity of superoxide dismutase and catalases. Level of the general protein in plasma of blood didn't change. Week introduction of akvadetrin lowered spontaneous diuresis due to strengthening of a tubular reabsorption of water, and two-week hypervitaminosis D – also due to decrease in speed of a glomerular filtration.

Keywords: hypervitaminosis D, akvadetrin, hypercalcemia, polycythemia, diuresis, filtration, reabsorption, proteinuria, hydroperoxide, malonic dialdehyde, superoxide dismutase, catalase.

Введение. Кальций, так же как натрий и калий, обеспечивая постоянство внутренней среды, участвует во многих процессах жизнедеятельности. И несмотря на то что суточная потребность кальция для взрослого человека около 1 г, в организме взрослого человека в виде различных малорастворимых соединений его находится от 1 до 2 кг кальция, при этом основная масса сосредоточена в костях, где он выполняет структурную функцию опорных тканей [1]. Кроме того, этот металл с 20-м порядковым номером в Периодической системе химических элементов Д.И. Менделеева оказывает и другие функции: транспортную, обеспечивая перенос различных веществ через мембраны; регуляторную, которая обусловлена способностью поддержания сосудистого тонуса и постоянства гемостаза, как IV фактора свертывающей

системы крови; метаболическую – как триггер активации многих ферментов и протеинов и их ингибирования; защитную, благодаря участию в дезинтоксикационных, антистрессовых и антиаллергических процессах [1].

Регуляция обмена кальция осуществляется паратгормоном, кальцитонином и кальцитриолом [9], причем каждый из этих гормонов воздействует на разные звенья метаболизма кальция и органы-мишени. Так, паратгормон преимущественно влияет на резорбцию кости, повышая в крови содержание кальция, а в почках увеличивает обратное всасывание и активирует образование кальцитриола, преимущественное действие которого направлено на всасывание кальция из кишечника [1].

Несмотря на то что большая часть кальция, поступающего в организм человека, выделяется через желудочно-кишечный тракт (до 25 ммоль), в почках за сутки фильтруется до 270 ммоль, но, в зависимости от суточного ритма (максимум в утренние часы), уровня гормонов, кислотно-основного состояния, характера пищи (углеводы усиливают выведение кальция), экскретируется с мочой только от 1,5 до 15 ммоль. При этом $\frac{2}{3}$ профильтрованного кальция с помощью ионных кальциевых каналов и АТФ-зависимых кальциевых насосов и обменных механизмов реабсорбируется в дистальных канальцах нефрона, 10-15% – в проксимальных, до 20% в петле Генле, и 2-8% в собирательных трубочках [1].

Так как в почках протекающие процессы аэробны и сопровождаются образованием таких токсических кислородных радикалов, как супероксидный анион радикал (O_2^{\bullet}), перекись водорода (H_2O_2), гидроксил перекиси (НО), синглетный кислород, озон, гипохлорит, пероксинитрит и другие [4], то будет логичным посмотреть состояние перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в зависимости от различного уровня кальция, в частности при гиперкальциемии, создаваемое избытком витамина D, к тому же в литературе встречались данные о том, что гипервитаминозы D и A увеличивают образование активных форм кислорода [10].

Целью нашего исследования было экспериментальное изучение влияния гиперкальциемии, созданной введением витамина D, на функции почек, состояние перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы и некоторые показатели крови.

Материалы и методы исследований. Модель гиперкальциемии создавали на 30 крысах линии Вистар путем ежедневного, в течение 14 дней, введения им через зонд в желудок аптечного препарата «Аквадетрим» (Польша) в дозе 10 000 МЕ/100 г вместе с 1,5-2 мл водопроводной воды. Введение аквадетрима с таким количеством воды позволяет и полностью его ввести, и избежать гидратации, которая могла бы усилить вымывание препарата и уменьшить его влияние. Для корректного сопоставления полученных результатов контрольная группа из 15 крыс также получала эквивалентное количество водопроводной воды. При

этом все животные на протяжении всего эксперимента имели свободный доступ к пище и воде, которая за 30-40 минут до начала опытов убиралась из клеток для предотвращения как обезвоживания, так и гипергидратации, то есть проводили исследования в условиях водного баланса. Световой режим соответствовал естественному.

Через семь дней введения аквадетрима ставили первые опыты, которые повторялись через неделю. Во время экспериментов животных помещали на шесть часов в специальные клетки для сбора мочи, в которой, а также в плазме крови, определяли содержание креатинина (метод Поппера) и мочевины (наборы фирмы «Ляхема»), степень протеинурии и общего белка (методы Лоури и биуретовый), кальция (метод Radin, Gramza) и неорганического фосфора [3]. В крови также определяли количество эритроцитов и содержание гемоглобина с помощью гематологического анализатора фирмы Erma (Япония), а о перекисном окислении липидов судили по содержанию гидроперекисей в плазме крови и малонового диальдегида в эритроцитах, а об антиоксидантной защите – по активности каталазы и супероксиддисмутазы в эритроцитах [2]. С помощью формул рассчитывали часовую спонтанный диурез (мл/час/100 г), скорость клубочковой фильтрации (мл/час/100 г) и канальцевую реабсорбцию воды (%). Об объемной скорости почечного кровотока судили по результатам, полученным инвазивным способом на ультразвуковом флуометре Transonic NT 313.

Полученные результаты статистически обрабатывались с применением параметрического метода сравнения средних величин, а степень достоверности оценивалась по t-критерию Стьюдента.

Полученные результаты. О гиперкальциемии можно говорить только при повышении в плазме крови содержания кальция, и его определение после недельного введения аквадетрима выявило достоверное ($p < 0,05$) повышение с контрольной величины в $2,32 \pm 0,17$ ммоль/л до $2,95 \pm 0,21$ ммоль/л. Продолжение введения витамина D еще в течение одной недели повысило содержание кальция в плазме крови до $3,24 \pm 0,28$ ммоль/л ($p < 0,002$). То есть развивающаяся гиперкальциемия, очевидно, вызывала изменения исследуемых показателей.

Обмен кальция в организме человека и млекопитающих наиболее тесно связан с фосфором, и изменение одного из этих элементов непременно сказывается на другом, к тому же 85,0% соединений кальция костей приходится на долю его ортофосфорной соли. Повышение концентрации кальция в плазме крови после введения крысам аквадетрима сопровождалось увеличением содержания неорганического фосфора с $1,28 \pm 0,1$ ммоль/л (контроль) до $1,69 \pm 0,12$ ммоль/л ($p < 0,02$) через одну неделю введения аквадетрима и $1,82 \pm 0,15$ ммоль/л ($p < 0,01$) при завершении двухнедельного эксперимента.

Одновременно с нарушением постоянства кальция в крови отмечалось повышение содержания конечного продукта креатин-фосфатной реакции, и являющегося важным показа-

телем работы почек – креатинина, который у контрольных животных был $70,52 \pm 2,65$ мкмоль/л, а после введения аквадетрима в течение одной недели стал $79,62 \pm 3,12$ мкмоль/л ($p < 0,05$), двух недель - повысился до $86,63 \pm 4,22$ мкмоль/л ($p < 0,002$).

В то же время гипервитаминоз D на конечный продукт метаболизма белка – мочевины, не оказал столь выраженного влияния, и недельное введение аквадетрима лишь незначительно повысило его содержание в плазме крови ($4,85 \pm 0,39$ ммоль/л – контроль, $5,49 \pm 0,42$ ммоль/л – опыт), но после двух недель ежедневного введения витамина D отличие стало достоверным ($6,95 \pm 0,53$ ммоль/л, $p < 0,05$).

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 аквадетрима).

Недельное введение аквадетрима крысам оказало только активирующее влияние на количество эритроцитов в периферической крови ($6,32 \pm 0,42 \cdot 10^{12}$ /л) и содержание гемоглобина ($143,22 \pm 2,94$ г/л), которые у контрольных крыс были $5,65 \pm 0,37 \cdot 10^{12}$ /л и $132,08 \pm 1,82$ г/л. Достоверные же отличия эти показатели приобрели только после двухнедельного введения аквадетрима, когда концентрация эритроцитов в крови стала $7,25 \pm 0,5 \cdot 10^{12}$ /л ($p < 0,02$), а содержание гемоглобина достигло уровня в $149,35 \pm 3,73$ г/л ($p < 0,002$). На то, что витамин D оказывает стимулирующее влияние на эритропоэз и его недостаточное поступление может способствовать развитию анемии, в литературе имеются ссылки [5; 7; 9], а повышение количества эритроцитов в периферической крови крыс только после двухнедельного введения аквадетрима, очевидно, можно объяснить тем, что на рост, созревание эритроцитов в красном костном мозге и их выход в периферическую кровь требуется пять дней, поэтому после недельных опытов только отмечалось стимулирующее влияние на эритропоэз.

Таким образом, ежедневное пероральное введение крысам линии Вистар аквадетрима в течение двух недель повышает в плазме крови содержание кальция и неорганического фосфора, креатинина и мочевины, в крови увеличивается количество эритроцитов и содержание гемоглобина, уровень общего белка в плазме крови не меняется.

На водовыделительную функцию почек введение аквадетрима оказало тормозящее влияние, и спонтанный диурез (табл. 1) у крыс после недельного приема витамина D снизился на 20,0% ($p < 0,05$), а при завершении двухнедельных экспериментов еще на столько же ($p < 0,01$). Изначально уменьшение количества выделяющейся мочи было обусловлено только усилением ($p < 0,02$) обратного всасывания воды в канальцах почек, так как скорость клубочковой фильтрации увеличилась на 14,0% (табл. 1), но с продолжением введения аквадетрима к остающейся на прежнем повышенном уровне канальцевой реабсорбции воды присоединилось уменьшение на 25,4% скорости клубочковой фильтрации, что и усилило снижение

спонтанного диуреза (табл. 1). То есть при двухнедельном введении крысам аквадетрима изменения обоих основных процессов мочеобразования способствовали уменьшению спонтанного диуреза.

Таблица 1

Спонтанный диурез, скорость клубочковой фильтрации, объем канальцевой реабсорбции воды и протеинурия у крыс при двухнедельном введении аквадетрима

Условия опытов	Стат. показат.	Диурез (мл/час/100 г)	Клубочковая фильтрация (мл/час/100 г)	Канальцевая реабсорбция (%)	Протеинурия (мг/мл)
Контроль	M±m // n	0,2±0,014 // n 14	13,76±1,15	98,51±0,08	0,076±0,006 // n 12
1 неделя	M±m	0,16±0,012	15,69±1,68	98,98±0,09	0,114±0,007
	n // p	14 // <0,05	>0,1	<0,02	12 // <0,05
2 неделя	M±m	0,12±0,009	10,26±0,64	98,87±0,1	0,145±0,011
	n // p	13 // <0,001	<0,02	<0,05	12 // <0,001

Отмеченное снижение скорости клубочковой фильтрации при завершении опытов, очевидно, было обусловлено уменьшением объемной скорости почечного кровотока, которая у контрольных крыс (n=7) была 11,48±0,72 мл/мин, а у экспериментальных (n=6) – 7,26±0,68 мл/мин (p<0,002), а при недельном введении аквадетрима особых изменений почечного кровотока (12,08±1,18 мл/мин, n=8) не отмечалось.

Несмотря на то что гипервитаминоз D не оказал влияние на содержание общего белка в плазме крови, однако 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).

При изучении влияния гиперкальциемии на пероксидацию липидов, о которой судили по содержанию в эритроцитах малонового диальдегида и гидроперекисей в плазме крови, было выявлено, что недельное введение аквадетрима способствовало достоверному повышению уровня гидроперекисей в 1,9 раза и малонового диальдегида в 1,6 раза, и при завершении экспериментов двухнедельного введения витамина D эти показатели еще больше увеличились – в 2,22 раза гидроперекиси и в 1,94 раза малонового диальдегида (табл. 2). То есть гиперкальциемия, создаваемая введением крысам витамина D, способствует развитию и усилению оксидативного стресса, и при этом прослеживается связь соразмерности изменений исследуемых показателей – в большей степени гидроперекисей, как первичных промежуточных липидных радикалов, по сравнению с малоновым диальдегидом, который относится ко вторичным продуктам пероксидации.

Таблица 2

Показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты у крыс

при двухнедельном введении аквадетрима

Условия опытов	Стат. показат.	Гидроперекиси (мкмоль/л)	Малоновый диальдегид (мкмоль/л)	Каталаза (10 ⁻⁴ МЕ/1 г Нб)	Супероксид-дисмутаза (ед. ингибир.)
Контроль	M±m // n	4,12±0,29 // 12	28,96±1,56 // 13	6,88±0,29 // 11	68,84±2,49 // 10
1 неделя	M±m	7,89±0,41	47,05±3,24	5,64±0,37	80,16±3,55
	n // p	14 // <0,001	12 // <0,001	10 // <0,02	9 // <0,02
2 неделя	M±m	9,16±0,38	56,28±4,12	5,12±0,42	85,73±4,56
	n // p	12 // <0,001	13 // <0,001	11 // <0,002	12 // <0,01

Изменение перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот сопровождалось нарушением активности ферментов антиоксидантной защиты, особенно ферментов, составляющих первую линии защиты – супероксиддисмутаза и каталазы. Так, активность супероксиддисмутаза, способной к инактивации радикалов кислорода, возникающих в ходе биологических реакций переноса электронов, после недельного введения крысам аквадетрима достоверно ($p<0,05$) снизилась, и с усилением гипервитаминоза D продолжала слабеть ($p<0,002$) (табл. 2). Снижение активности этого фермента, чей каталитический цикл включает восстановление и окисление иона металла на его активном центре и имеет три формы (содержащий медь в цитозоле, цинк в эндотелии и марганец в матриксе митохондрий), может быть обусловлено тем, что кальций, а тем более повышенное его содержание, оказывает конкурирующее действие с цинком на уровне всасывания в кишечнике [6].

Аналогично супероксиддисмутаза снижалась активность другого фермента антиоксидантной защиты, способного восстанавливать перекись водорода до воды, максимальная концентрация которой обнаружена в эритроцитах – каталазы [4]. Активность каталазы по мере введения аквадетрима уменьшалась до значений, имеющих достоверное отличие как в конце первой ($p<0,02$), так и второй ($p<0,002$) недели (табл. 2).

Таким образом, ежедневное, в течение двух недель, введение половозрелым крысам линии Вистар водного раствора витамина D «Аквадетрим» в дозе 10 000 МЕ/100 г повышает в крови содержание кальция и неорганического фосфора, креатинина и мочевины, количество эритроцитов и гемоглобина, уровень общего белка в плазме крови не меняется, усиливает пероксидацию липидов (повышение гидроперекисей и малонового диальдегида) и ослабляет антиоксидантную защиту (снижение активности супероксиддисмутаза и каталазы). Недельное введение аквадетрима уменьшает спонтанный диурез за счет усиления канальцевой реабсорбции воды, а двухнедельный гипервитаминоз – еще и за счет одновременного снижения скорости клубочковой фильтрации.

Список литературы

1. Гайтон А.К., Холл Дж.Э. Медицинская физиология / пер. с англ. – М. : Логосфера, 2008. – 1296 с.
2. Справочник по лабораторным методам исследования / под ред. Л.А. Даниловой. – СПб. : Питер, 2003. – 736 с.
3. Рябов С.И., Наточин Ю.В., Бондоренко Б.Б. Диагностика болезней почек. – Л. : Медицина, 1979. – 256 с.
4. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. Молекулярно-клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах // Международный журнал экспериментального образования. – 2006. – № 7. – С. 29-36.
5. Atkinson M.A., Melamed M.L., Kumar J. et al. Vitamin D, race, and risk for anemia in children // J. Pediatr. – 2014. – Vol. 164, N. 1. – P. 153-158.
6. Dijkhuizen M.A., Wieringa F.T., West C.E. et al. Effects of iron and zinc supplementation in Indonesian infants on micronutrient status and growth // J. Nutr. – 2001. – Vol. 131. – P. 2860-2865.
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. – N. 4. – P. 123-128.
8. Norman A.W. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health // Am.J.Clin.Nutr. – 2008. – Vol. 88, N. 2. – P. 491-9.
9. Sim J.J., Lac P.T., Liu I.L. et al. Vitamin D deficiency and anemia: a cross-sectional study // Ann Hematol. – 2010. – Vol. 89, N. 5. – P. 447-452.
10. Suzuki Y.J., Forman H.J., Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction // Free Radical Biol. Med. – 1996. – Vol. 22, N. 1/2. – P. 269-285.

Рецензенты:

Бибаева Л.В., д.м.н., профессор, проректор по НИР и заведующая кафедрой биологии и гистологии Северо-Осетинской государственной медицинской академии, г. Владикавказ.

Урумова Л.Т., д.м.н., доцент кафедры патологической физиологии Северо-Осетинской государственной медицинской академии, г. Владикавказ.