

УДК 616.092-09; 616.61-002; 001.6

МОЧЕОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ ПОЧЕК ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КАЛЬЦИТОНИНОПОСРЕДОВАННОЙ ГИПОКАЛЬЦИЕМИИ НА ФОНЕ ТОКСИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

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

¹Северо-Осетинская государственная медицинская академия. Владикавказ, Россия (362019, Владикавказ, ул. Пушкинская, 40), inal44@mail.ru

²Институт биомедицинских исследований Владикавказского научного центра РАН и Правительства РСО-Алания. Владикавказ, Россия (362025, Владикавказ, ул. Пушкинская, 47)

Введение 30 крысам линии Вистар глицерина в дозе 0,8 мл/100 г с последующим проведением опытов на 7-й и 14-й дни характеризуется протеинурией, снижением спонтанного диуреза в результате торможения объемной скорости почечного кровотока и ослабления клубочковой фильтрации. Экспериментальная гипокальциемия, созданная на 20 крысах ежедневным в течение двух недель в/м введением кальцитонина в дозе 6,0 МЕ/кг дважды в сутки, вызывает протеинурию, повышение диуреза из-за ускорения почечного кровотока и клубочковой фильтрации. Одновременно отмечается торможение канальцевой реабсорбции воды вследствие уменьшения осмотического давления в интерстиций слоев ткани почек, обусловленного снижением содержания мочевины и натрия. Двухнедельное введение 20 крысам кальцитонина на фоне токсического поражения почек снимает вызванное введением глицерина торможение диуреза и угнетение скорости клубочковой фильтрации, но усиливает степень протеинурии.

Ключевые слова: токсическое поражение почек, гипокальциемия, спонтанный диурез, кальцитонин, протеинурия, креатинин, мочевины и натрийинтерстиций почек

WATER-EXCRETORY RENAL FUNCTION IN EXPERIMENTAL HYPOCALCEMIA MEDIATED BY CALCITONIN AGAINST THE TOXIC RENAL FAILURE

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

¹North Ossetian State Medical Academy, Vladikavkaz, Russia (362019, Vladikavkaz, st. Pushkinskaya, 40), 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, Russia (362025, Vladikavkaz, st. Pushkinskaya, 47)

Introduction 30 Wistar rats at a dose of glycerol, 0.8 ml / 100g and followed by experiments on the 7th and 14th days characterized by proteinuria, decreased urine output as a result of spontaneous braking volumetric rate of renal blood flow and glomerular filtration attenuation. Experimental hypocalcemia, created on 20 rats daily for two weeks, in / m introduction of calcitonin at a dose of 6.0 IU / kg twice a day causes proteinuria, increased urine output due to the acceleration of renal blood flow and glomerular filtration rate. At the same time it marked inhibition of tubular reabsorption of water by reducing the osmotic pressure in the intersticium of kidney tissue layers due to a decrease in urea and sodium. The two-week introduction on 20 of calcitonin, against toxic injuries of kidneys removes inhibition of diuresis, caused by the introduction of glycerol and inhibition of glomerular filtration rate, but increases the degree of proteinuria.

Keywords: toxic nephritis, hypocalcemia, spontaneous diuresis, calcitonin, proteinuria, creatinine, urea and sodium renal interstitium

Процессы, протекающие в отдельных органах человека и животных, всегда тесно взаимосвязаны, и при их нарушениях возникают различные патологические состояния, способные привести к заболеваниям. В частности, для гормонов, регулирующих обмен кальция, точкой приложения, кроме костей и кишечника, являются почки [2, 8]. Так как кальций формирует скелет, влияет на процессы свертывания крови, обмен веществ, регулирует мышечное сокращение, кислотно-щелочной баланс, секрецию гормонов, проницаемость сосудов, оказывает противовоспалительное действие и многое другое, то его

недостаток может быть вызван активным выведением с мочой, нарушением всасывания из кишечника, изменением содержания кальцийрегулирующих гормонов или возможным сбоем чувствительности рецепторов к ним. Не исключается и нарушение высвобождения кальция из костной ткани. При этом появляются боли и судороги в мышцах, отмечается общее напряжение, затруднение дыхания, нарушается проводимость миокарда, возникают декальцинация костей и остеопороз. Повышение же концентрации кальция в крови может быть обусловлено его активным всасыванием в желудочно-кишечном тракте, особенно при потреблении продуктов с высоким его содержанием, и усилением синтеза и секреции паратиринина и кальцитриола. Гиперкальциемию могут спровоцировать длительный постельный режим, злокачественные новообразования, вызывающие разрушение костей, наследственные множественные эндокринные неоплазии (синдромы Вермера, Сиппла, Горлина) [7, 9, 10].

Целью настоящей работы стало изучение мочеобразовательной функции почек при гипокальциемии, вызванной введением кальцитонина на фоне острой почечной недостаточности.

Материал и методы исследования. Для решения поставленной цели были сформулированы и решались следующие задачи.

1. Создание токсической почечной недостаточности по G. Greven (внутримышечное введение 50,0%-ного глицерина в дозе 0,8 мл/100 г 30 крысам линии Вистар после суточного лишения их пищи и воды). Нашей модификацией этой модели для снижения гибели животных являлось то, что дозу вводили не в одну, а в обе задние лапы [4].
2. Создание на 20 крысах линии Вистар модели гипокальциемии путем подкожного введения кальцитонина, в качестве которого использовали аптечный препарат миакальцик (Novartis Pharma, Швейцария) – синтетический аналог гормона лосося, обладающий более высоким сродством к рецепторам, действующий сильнее и продолжительнее, в дозе 6 МЕ/кг (1 МЕ соответствует 0,2 мкг кальцитонина), который вводили утром и вечером (12 МЕ/сут/кг) в течение 14 дней. Одни авторы [1] вводят миакальцик в дозе 0,6 МЕ/100 г один раз в день, другие [6] в большей дозе – 2,0 мкг/кг, что равно 10 МЕ/кг, а в инструкции по применению кальцитонина лосося указано, что крысам линии Sprague-Dawley и Fisher 344 его вводили в течение года в дозах от 20 до 80 МЕ/кг/сут, что вызывало аденому гипофиза. Выбор нами двукратного в течение суток введения миакальцика был обусловлен более длительным поддержанием в крови его гипокальциемического эффекта, который наступает через 30 мин и длится до 1,5 ч (период полувыведения препарата). При однократном введении его способность снижать уровень кальция в крови будет не столь

продолжительна, и, возможно, произойдет ослабление эффекта препарата или даже нормализация содержания кальция в крови.

3. Одновременное создание на 20 крысах линии Вистар токсического поражения почек и гипокальциемии.

Контрольную группу составляли 15 крыс линии Вистар, получавших инъекции физиологического раствора в количестве, эквивалентном вводимому миакальцику. На протяжении двух недель опытов все животные имели свободный доступ к пище и воде, которые перед началом экспериментов для предотвращения гидратации и наполнения желудка убирались из клеток за 30–40 мин. В дневное время суток виварий был затемнен, что является естественным для крыс, ведущих ночной образ жизни.

Во всех группах крыс (контрольных, после отдельного введения глицерина и миакальцика и при их совместном введении) эксперименты проводили на 7-й и 14-й дни, когда животных на 6 ч помещали в клетки для сбора мочи, в которой определяли содержание эндогенного креатинина по методу, основанному на реакции Яффе (изменение окраски пикриновой кислоты при взаимодействии с креатинином в щелочной среде) для последующего, после определения уровня креатинина в крови (мкмоль/л), расчета скорости клубочковой фильтрации (мл/час/100 г) и величины канальцевой реабсорбции воды (%). Объемную скорость почечного кровотока (мл/мин) определяли с помощью ультразвукового флуометра Transonic NT313 (США). О степени протеинурии (мкг/мл) и содержании общего белка в плазме крови (г/л) судили по результатам, полученным методом Лоури и биуретовым методом [5]. Концентрацию кальция в плазме крови (ммоль/л) как доказательство состоявшейся гипокальциемии определяли с помощью эриохрома синего [5]. Содержание натрия в слоях ткани почек определяли методом плазменной фотометрии (ПФА 378, «Юнико-СИС», Россия), а мочевины — наборами Лахема (Чехия). Все биохимические исследования проводили спектрофотометрически (UNICO 800, США). Вывод части животных из эксперимента на 7-й и 14-й дни (по 5 крыс во всех исследуемых группах) происходил с соблюдением Приказа Минздравсоцразвития России № 708н от 23 августа 2010 г. «Об утверждении Правил лабораторной практики» в состоянии обезболивания и сна после внутрибрюшинного введения крысам анестетика общего действия «Золетил» (Франция) в дозе 0,1–0,15 мл/100 г.

Полученные результаты статистически обрабатывались с помощью программы «GraphPad Prism 5.04», достоверность отличий оценивалась с помощью t-критерия Стьюдента для параметрического метода сравнения средних величин.

Результаты и их обсуждение. С учетом того, что мы ставили перед собой цель выяснения влияния гипокальциемии на водовыделительную функцию почек в условиях

токсического поражения, то посчитали необходимым начать описательную часть с содержания кальция в плазме крови в дни опытов. Введение миакальцика вызвало снижение уровня кальция с контрольного уровня в $2,32 \pm 0,19$ ммоль/л до $2,06 \pm 0,13$ ммоль/л на 7-й день, а на 14-й день введения – до $1,87 \pm 0,15$ ммоль/л ($p < 0,02$). Следовательно, все результаты состояния водовыделительной функции почек при токсическом поражении почек можно однозначно констатировать как происходящие при гипокальциемии.

Ранее нами было показано [3], что введение крысам глицерина вызвало статистически значимое ($p < 0,002$) снижение спонтанного диуреза в результате уменьшения скорости клубочковой фильтрации на 21,8% ($p < 0,05$) и на 43,5% ($p < 0,001$) соответственно. Причиной этого было ослабление объемной скорости почечного кровотока с $10,24 \pm 0,68$ мл/мин (контроль) до $8,08 \pm 0,73$ мл/мин ($p < 0,05$) на 7-й день и до $6,94 \pm 0,52$ мл/мин ($p < 0,002$) на 14-й день после введения нефротоксиканта. При этом к концу 2-й недели уровень креатинина в плазме крови повысился до $84,25 \pm 3,23$ мкмоль/л ($p < 0,01$), и одновременно, причем уже на 7-й день, появилась протеинурия, которая на 14-й день была значительно больше контроля (табл. 1).

Созданная введением миакальцика гипокальциемия вызвала повышение спонтанного шестичасового диуреза с контрольного уровня в $0,19 \pm 0,01$ мл/час/100 г на 42,1% ($p < 0,002$) на 7-й день, и еще значительней – на 63,1% на 14-й день. Причинами полиурии были как ускорение клубочковой фильтрации, так и снижение канальцевой реабсорбции воды (табл. 1). Однако основным фактором повышения диуреза являлась гломерулярная фильтрация, которая после введения кальцитонина в течение 7 дней превышала контроль на 50,0% ($p < 0,002$), а после 14 дней – на 64,3% ($p < 0,001$). Изменение фильтрации было обусловлено соразмерным ускорением объемной скорости почечного кровотока (до $14,86 \pm 0,85$ мл/мин и $16,25 \pm 1,12$ мл/мин на 7-й и 14-й дни постановки экспериментов соответственно).

Таблица 1

Показатели функции почек у крыс при токсическом поражении почек при отдельном введении кальцитонина и на фоне токсического поражения почек

Условия опытов	Стат. показат.	Диурез (мл/час/100г)	Клубочковая фильтрация (мл/час/100г)	Канальцевая реабсорбция (%)	Протеинурия (мкг/мл)
Контроль	M±m	$0,19 \pm 0,01$	$12,83 \pm 0,94$	$98,88 \pm 0,07$	$6,35 \pm 0,58$
При токсическим поражение почек					
на 7-й день после введения глицерина	M±m	$0,14 \pm 0,015$	$10,16 \pm 0,72$	$98,62 \pm 0,14$	$11,12 \pm 0,98$
	P _{конт.}	<0,02	<0,05	*	<0,05
на 14-й день после введения глицерина	M±m	$0,12 \pm 0,009$	$7,25 \pm 0,46$	$98,67 \pm 0,12$	$20,04 \pm 1,86$
	P _{конт.}	<0,001	<0,001	*	<0,001
При гипокальциемии					

введение кальцитонина в течение 7 дней	M±m	0,27±0,02	19,25±1,70	98,59±0,08	10,25±0,84
	P _{конт.}	<0,002	<0,002	<0,05	<0,001
введение кальцитонина в течение 14 дней	M±m	0,31±0,02	21,08±1,77	98,53±0,07	12,58±1,07
	P _{конт.}	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001
При гипокальциемии на фоне токсического поражения почек					
на 7-й день после введения глицерина и кальцитонина в течение 7 дней	M±m	0,21±0,02	15,37±1,12	98,63±0,11	15,25±1,18
	P _{конт.}	*	*	*	<0,001
	P _{глиц./P_{гк.}}	<0,002/<0,01	<0,001/<0,05	* // *	<0,02 // <0,01
на 14-й день после введения глицерина и кальцитонина в течение 14 дней	M±m	0,24±0,02	17,09±1,50	98,59±0,14	22,65±1,34
	P _{конт.}	<0,01	<0,001	*	<0,001
	P _{глиц./P_{гк.}}	<0,001/<0,05	<0,001/<0,05	* // *	* // <0,002

* — отсутствие статистически значимых отличий, P_{конт.}, P_{глиц.}, P_{гк.} – сравнение с данными контроля токсического поражения почек глицерином и полученными при гипокальциемии

Содержание креатинина в плазме крови как после семикратного (75,64±3,08 мкмоль/л), так и двухнедельного (78,36±3,45 мкмоль/л) введения кальцитонина, несмотря на тенденцию к повышению, не имело статистически значимого отличия от контроля (72,64±2,28 мкмоль/л), в то время как уровень белка в моче достоверно (p<0,001) превышал норму, особенно после двухнедельного введения – почти в 2 раза (табл. 1).

При создании гипокальциемии на фоне токсического поражения почек водовыделительная функция почек отличалась от данных и при глицериновом поражении почек, и при гипокальциемии. В этом варианте на 7-й день постановки экспериментов основные процессы мочеобразования не имели достоверного отличия от контроля, но по сравнению с результатами, полученными после рабдомиолизного поражения почек, диурез и скорость клубочковой фильтрации у крыс были на 50,0% и 51,3% больше (p<0,001), а по сравнению с гипокальциемическим состоянием – наоборот, на 22,3% и 21,2% меньше (p<0,01). Канальцевая реабсорбция не менялась (табл. 1). В опытах, поставленных на 14-й день, эта направленность изменений диуреза и клубочковой фильтрации сохранилась, и при этом еще появились статистически значимые отличия от контроля (табл. 1). Что касается содержания креатинина в плазме крови, то оно было больше, чем при отдельном глицериновом поражении почек и при гипокальциемии (85,64±3,85 мкмоль/л на 7-й день и 92,46±3,12 мкмоль/л на 14-й день). Аналогичное отличие наблюдалось и в степени протеинурии (табл. 1).

Так как при расчете канальцевой реабсорбции воды было выявлено ее статистически значимое снижение при гипокальциемии, то мы посчитали необходимым исследовать в слоях ткани почек содержание мочевины и натрия как основных осмотически активных

веществ, создающих давление в интерстициальной почечной ткани и способных оказывать влияние на обратное всасывание воды в канальцах. Проведенные исследования показали снижение содержания мочевины во всех слоях ткани почек, а натрия — только в корковом и мозговом веществах (табл. 2).

Таблица 2

Содержание мочевины (мкмоль/г влажного веса) и натрия (мкмоль/г сухого веса) в слоях ткани почек крыс с гипокальциемией

Условия опытов и исследуемые вещества		Стат. показат.	Корковое вещество	Мозговое вещество	Почечный сосочек
Контроль	Мочевина	M±m	30,82±1,22	67,75±2,87	202,38±6,02
	Натрий		27,86±0,82	44,94±1,35	95,12±2,65
При гипокальциемии					
введение кальцитонина в течение 7 дней	Мочевина	M±m	26,92±0,85	59,21±1,66	184,26±4,93
		P _{конт.}	<0,02	<0,02	<0,05
	Натрий	M±m	23,55±0,68	39,75±1,74	88,76±3,87
		P _{конт.}	<0,01	<0,05	*
введение кальцитонина в течение 14 дней	Мочевина	M±m	25,57±1,06	57,34±2,18	181,37±4,56
		P _{конт.}	<0,01	<0,01	<0,02
	Натрий	M±m	22,94±0,84	38,48±2,02	86,92±4,85
		P _{конт.}	<0,002	<0,05	*

* — отсутствие статистически значимых отличий

При этом уменьшение содержания этих веществ, несмотря на статистически значимые отличия, было не столь значительным – в среднем от 10% (на 7-й день) до 18% (на 14-й день). Поэтому и ослабление канальцевой реабсорбции воды было также не столь значительным (табл. 1).

Таким образом, токсическое глицериновое поражение почек в течение двух недель характеризуется протеинурией, снижением спонтанного диуреза и ослаблением клубочковой фильтрации. Экспериментальная гипокальциемия, созданная ежедневным в течение двух недель введением кальцитонина, также вызывает протеинурию, но повышает диурез вследствие ускорения клубочковой фильтрации и торможения канальцевой реабсорбции воды в результате уменьшения осмотического давления в интерстициальных слоях ткани почек. Двухнедельное введение кальцитонина на фоне токсического поражения почек снимает вызванное введением глицерина торможение диуреза и угнетение скорости клубочковой фильтрации, но усиливает степень протеинурии.

Список литературы

1. Ахполова В.О. Особенности развития почечных проявлений свинцовой интоксикации у крыс в условиях измененного кальциевого гомеостаза: Автореф. дис. канд. мед. наук. – Владикавказ, 2011. – 20 с.
2. Гайтон А.К., Холл Дж.Э. Медицинская физиология / Пер. с англ. – М.: Логосфера, 2008. – 1296 с.
3. Джиев И.Г., Козаев А.В., Кабоева Б.Н., Батагова Ф.Э. Механизмы водовыделительной функции почек при экспериментальной острой почечной недостаточности на фоне гиперкальциемии // Фундаментальные исследования. –2014. – №10, ч. 10. – С. 1924–1928
4. Джиев 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
5. Камышников В.С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика. – Минск: Интерпрессервис. – 2003. –Т. 2. – 463 с.
6. Макинтайр А., Перретти М., Манчини Л. Применение кальцитонина в качестве комбинированной терапии для лечения воспалительных болезненных состояний. Патент №2007139888/15, 30.03.2006.
7. Малая энциклопедия врача-эндокринолога / Под ред. А.С. Ефимова. – К.: Медкнига, 2007. – 360 с.
8. Фундаментальная и клиническая физиология / Под ред. А.А. Камкина, А.Г. Каменского. – М.: Академия, 2004. – 1073 с.
9. Храйчик Д., Седор С., Ганц М. Секреты нефрологии. – М.: Вином; СПб. – Невский диалект, 2001. – 302 с.
10. Carney J.A. Familial multiple endocrine neoplasia: the first 100 years // Amer. J. Surg. Pathol. – 2005. –Vol. 29, № 2, – P. 254–274.

Рецензенты:

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

Болиева Л.З., д.м.н., профессор, ГБОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Владикавказ.