

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«СЕВЕРО-ОСЕТИНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ
АКАДЕМИЯ»**
Министерства здравоохранения Российской Федерации

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

ХУБУЛОВ Инал Гурамович

**ФУНКЦИИ ПОЧЕК ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПОЧЕЧНОЙ
НЕДОСТАТОЧНОСТИ И ИЗМЕНЁННОМ
КАЛЬЦИЕВОМ ГОМЕОСТАЗИСЕ**

**Группа научных
специальностей**

3.3. Медико-биологические науки

Научная специальность

3.3.3. Патологическая физиология

Научный руководитель

доктор медицинских наук, профессор,
заслуженный деятель науки РСО-Алании,
заведующий кафедрой патологической физиологии
ФГБОУ ВО СОГМА Минздрава России
Джигоев Инал Германович

Владикавказ, 2022

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Роль кальция для человека и животных чрезвычайно многогранная (основная составная часть костей и зубов; обеспечивает целостность мембран и поддержание их нормальной проницаемости; один из вторичных посредников; способствует выделения медиаторов в синаптическую щель; запускает процесс мышечного сокращения; участвует в проведении нервных импульсов, в работе ионных каналов, регуляции деятельности ферментов и секреции таких гормонов как паратирин, кальцитонин, инсулин, катехоламины, гипофиза; необходим для процесса оплодотворения; поддерживает кислотно-основное и осмотическое равновесие; в формирует силу иммунного ответа; способствует фагоцитозу и миграции клеток, их связи с внеклеточным матриксом; активирует поступление глюкозы в клетки; необходим для нормальной работы генома; является важным фактором гемокоагуляции; снижает холестерин крови; стабилизирует тучные клетки и тормозит освобождение гистамина, снижая проявления воспаления, аллергических реакций и боли. Роль кальция для человека нельзя охарактеризовать как «очень важный», так как проще назвать процессы, в которых он не принимает участия, чем перечислить все, нормальное течение которых возможно только в его присутствии.

Суточная потребность кальция для взрослого человека около 1 г, но в организме его в виде различных малорастворимых соединений находится от 1 до 2 кг, в крови, как одного из постоянных жестких констант (снижение на 0,8-1,0 ммоль/л несовместима с жизнью) около 2,5 ммоль/л, но все-таки концентрация иона в крови может как повышаться, так и снижаться. Отсюда очевидна целесообразность изучения функционирования различных органов и систем в условиях измененного обмена кальция. Причины, способные привести к гипер- и гипокальциемии могут быть различные заболевания почек, печени, костей, кишечника, изменение содержания кальцийрегулирующих гормонов или чувствительности к ним рецепторов и многое другое.

Регуляция обмена кальция осуществляется паратгормоном, кальцитонином и кальцитриолом, 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 образования кальцитриола, преимущественное действие которого направлено на всасывание кальция из кишечника.

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.

Недостаток кальция 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. А повышение может быть обусловлена его активным всасыванием в желудочно-кишечном тракте, усилением синтеза и секреции паратирин, длительный постельный режим, разрушение костей, наследственные множественные эндокринные неоплазии.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Тема диссертационной работы входит в основной план НИР ФГБОУ ВО СОГМА Минздрава России по направлению «Анатомия, физиология и патология висцеральных систем».

Разрешение на проведение экспериментов на лабораторных крысах линии Вистар было получено этическим комитетом академии 29 ноября 2018 года, протокол № 8.7.

Целью работы было выяснение водовыделительной функции почек при экспериментальной почечной недостаточности в условиях изменённого кальциевого гомеостаза, которое выражалось гипер- и гипокальциемией.

Для решения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. В условиях экспериментальной модели гиперкальциемии, создаваемой пероральным в течение двух недель введением витамина D (аквадетрим)

в дозе 10 тыс. МЕ/100г исследовать спонтанный диурез, основные процессы мочеобразования (скорость клубочковой фильтрации и объём канальцевой реабсорбции воды), содержание в плазме крови кальция и фосфора, с расчётом показателей их обработки в почках (экскреция, фильтрационный заряд, реабсорбция и экскретируемая фракция), содержание креатинина, мочевины и общего белка в плазме крови, показатели крови (количество эритроцитов и гемоглобина, состояния антиоксидантной системы по активности каталазы и супероксиддисмутазы и пероксидации липидов по содержанию малонового диальдегида и гидроперекисей).

2. В условиях экспериментальной модели гипокальциемии, создаваемой хирургическим удалением паращитовидных желёз (первая модель, с проведением исследований через полтора месяца у крыс с низким содержанием кальция в крови) и двухнедельным в/м введение кальцитонина (миокальцик) в дозе 0,6 МЕ/100г (вторая модель) исследовать спонтанный диурез, основные процессы мочеобразования (скорость клубочковой фильтрации и объём канальцевой реабсорбции воды), содержание в плазме крови кальция и фосфора, с расчётом показателей их обработки в почках (экскреция, фильтрационный заряд, реабсорбция и экскретируемая фракция), содержание креатинина, мочевины и общего белка в плазме крови, показатели крови (количество эритроцитов и гемоглобина, состояния антиоксидантной системы по активности каталазы и супероксиддисмутазы и пероксидации липидов по содержанию малонового диальдегида и гидроперекисей).
3. В условиях экспериментальной модели почечной недостаточности создаваемой в/м введением 0,8 мл/100г 50,0% глицерина (трёхкратно, вначале, через две недели и в конце месяца) исследовать спонтанный диурез, основные процессы мочеобразования (скорость клубочковой фильтрации и объём канальцевой реабсорбции воды), содержание в плазме крови кальция и фосфора, натрия и калия с расчётом показателей их обработки в почках (экскреция, фильтрационный заряд, реабсорбция и экскретируемая фракция), содержание креатинина, мочевины и общего

белка в плазме крови и их экскреции с мочой, состояния антиоксидантной системы по активности каталазы и супероксиддисмутазы и пероксидации липидов по содержанию малонового диальдегида и гидроперекисей.

4. В условиях экспериментальной модели почечной недостаточности на фоне гиперкальциемии исследовать спонтанный диурез, основные процессы мочеобразования (скорость клубочковой фильтрации и объём канальцевой реабсорбции воды), содержание в плазме крови кальция и фосфора, натрия и калия с расчётом показателей их обработки в почках (экскреция, фильтрационный заряд, реабсорбция и экскретируемая фракция), содержание креатинина, мочевины и общего белка в плазме крови и их экскреции с мочой, состояния антиоксидантной системы по активности каталазы и супероксиддисмутазы и пероксидации липидов по содержанию малонового диальдегида и гидроперекисей.
5. В условиях экспериментальной модели почечной недостаточности на фоне гипокальциемии исследовать спонтанный диурез, основные процессы мочеобразования (скорость клубочковой фильтрации и объём канальцевой реабсорбции воды), содержание в плазме крови кальция и фосфора, натрия и калия с расчётом показателей их обработки в почках (экскреция, фильтрационный заряд, реабсорбция и экскретируемая фракция), содержание креатинина, мочевины и общего белка в плазме крови и их экскреции с мочой, состояния антиоксидантной системы по активности каталазы и супероксиддисмутазы и пероксидации липидов по содержанию малонового диальдегида и гидроперекисей.

Научная новизна работы состоит в том, что проведенные исследования функции почек в условиях экспериментальных моделей почечной недостаточности на фоне гипер-и гипокальциемии, создаваемые трехкратным в/м введением глицерина, пероральным, в течение двух недель, введением витамина D, хирургическим удалением паращитовидных желёз и двухнедельным в/м введением кальцитриола, вызывают изменение спонтанного диуреза, основных процессов мочеобразования, осмолярности слоёв ткани почек, скорости почечного кровотока, содержания в крови и моче креатинина, мочевины, общего белка, экскреции

электролитов, количество эритроцитов и содержание гемоглобина в крови, антиоксидантную систему и перекисидацию липидов.

Исследования носят экспериментальный характер, а полученные результаты относятся к области фундаментальных знаний, расширяя наше представление новых механизмах функции почек при их поражении на фоне гипер- и гипокальциемии, что, несомненно имеет не только теоретическое, но и практическое значение.

Материалы диссертации внедрены в учебный и научный процессы и используются на кафедре патологической физиологии и ЦНИЛ Северо-Осетинской государственной медицинской академии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили на 150-и половозрелых лабораторных крысах линии Вистар примерно одинакового веса (от 175 до 240 г, со средним весом 205 ± 15 г), которые были разделены следующим образом: контрольная группа (30 крыс); с моделью гиперкальциемии (30 крыс); с моделью гипокальциемии (30 крыс); с моделью почечной недостаточности (30 крыс); с моделью почечной недостаточности на фоне гиперкальциемии (30 крыс); с моделью почечной недостаточности на фоне гипокальциемии (30 крыс).

Создание экспериментальных моделей

Модель экспериментальной гиперкальциемии создавали путем ежедневного, в течение двух недель введения крысам витамина D в виде аптечного препарата «Аквдетрим» (Польша) в дозе 10 тыс. МЕ/100г, который добавляли к 1 мл водопроводной воды и вводили с помощью зонда в желудок один раз в день.

Модель гипокальциемии создавали путем оперативного удаления околощитовидных желез в состоянии обезболивания и сна (внутрибрюшинное введение 0,1-0,15 мл золетила – анестетика общего действия, Франция). Воротникообразный разрез в шейной области, выделяя щитовидную железу, в толще которой по обе стороны от срединной доли находили по две пары околощитовидных желез и выжигали их термокаутером. Через 1,5 месяца у крыс наблюдались классические признаки гипокальциемии: ухудшение общего состояния, снижение веса, появлялась судорожная готовность, а у некоторых и судороги, изменение зубов, их ломкость, выпадение шерсти, а у части развивалась катаракта.

Вторая модель гипокальциемии была создана на крысах линии Вистар 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 0,6 МЕ/100г (1 МЕ соответствует 0,2 мкг кальцитонина), который вводили утром и вечером в течение 14 дней.

Экспериментальную токсическую почечную недостаточность по G.Greven моделировали на 60-и крысах линии Вистар путем внутримышечного введения 0,80 мл/100г 50,0% глицерина после предварительного, в течение суток, лишения крыс пищи и воды. Для безопасности и уменьшения гибели животных половину дозы вводили в правую заднюю лапу, а другую – в левую.

Методы исследований

Во время экспериментов со сбором мочи 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 «Лахема»), степень протеинурии и общего белка (методы Лоури и биуретовый), кальция (метод Radin, Gramza) и неорганического фосфора. Содержание кальция определяли спектрофотометрически с помощью эриохрома синего, а неорганического фосфора – молибденокислым аммонием. В крови также определяли количество эритроцитов и содержание гемоглобина с помощью гематологического анализатора фирмы Егма (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. В слоях ткани почек определяли содержание мочевины и натрия, определяющие осмотическое давление, от которого зависит объём канальцевой реабсорбции воды и соответственно количество выделившейся мочи. Об объемной скорости почечного кровотока судили по результатам, полученным инвазивным способом на ультразвуковом флуометре Transonic HT 313 (США).

С помощью формул рассчитывали часовой спонтанный диурез (мл/час/100г), скорость клубочковой фильтрации (мл/час/100г) и канальцевую реабсорбцию воды (%), экскрецию кальция и фосфора (мкмоль/час/100г), их фильтрационные заряды (мкмоль/час/100г) и относительные канальцевые реабсорбции.

О морфологической характеристике почек судили после их фиксации, изготовления мазков (толщина срезов 5-6 мкм, окраска гематоксилин-эозином) и световой микроскопии (увеличение в 600 и 1500 раз) с фотографированием препаратов (Микмед-2 со встроенным Nikon).

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 проводить исследования в условиях водного баланса. Световой режим соответствовал естественному.

Содержание и уход за крысами, постановка и выведение их из опытов проводили в соответствии с приказом Минздрава России «Об утверждении Правил лабораторной практики» за № 199н от 1 апреля 2016 года.

Полученные результаты статистически обрабатывали с использованием программ «GraphPad Prizm 8.01» и «Statistica 10». О достоверности судили при отличий от данных контроля, если вероятность ошибки (p) была равна или меньше 0,05, то есть доверительный интервал вероятности был значим. Метод сравнения средних параметрический с t -критерием Стьюдента и учётом нормальности распределения данных на основании критерия Шапиро-Уилка. При сопоставлении двух показателей использовали коэффициент линейной корреляции (r) Пирсона.

СОБСТВЕННЫЕ ДАННЫЕ

Изучение морфологической картины почек выявило, что недельное введение крысам аквадетрима вызвало в корковом веществе неравномерный застой микроциркуляции с мелкими диапедезными кровоизлияниями, что было и в капиллярах клубочка, где также отмечалось расширением полости капсулы. Проксимальные извитые канальцы были с высоким гипертрофическим эпителием и узкими просветами, а дистальные, наоборот, с низким кубическим гетероморфным, и с расширением просветов. В мозговом веществе отмечалось застойное полнокровие капилляров, с набухшими ядрами эпителия канальцев и неравномерным расширением их просвета, в то время как интерстициальные пространства и в корковом, и в мозговом веществах сужены.

Продолжение витаминизации способствовало тому, что в корковом веществе начала отмечаться слабовыраженная очаговая гиалиново-капельная дистрофия

канальцевого нефротелия. Очаговая пылевидная эозинофильная и базофильная грануляция цитоплазмы эпителиоцитов, находящихся в состоянии некробиоза. В просвете отдельных канальцев рыхлые белковые массы и эпителиальные дескваты. Продуктивный васкулит и плазматическое пропитывание стенок микроциркуляторных сосудов. Имелись канальцы с умеренной гетерогенностью эпителия и свободными узкими просветами. Интерстициальные пространства сдавлены за счет деструктивных процессов в канальцах. Очаг кровоизлияния, вокруг которых имелись моноклеарные инфильтраты. В мозговом веществе отмечался резко выраженный застой в микроциркуляции с участками плазморрагий. Эпителий канальцев с дистрофичными элементами, особенно в зоне плазморрагий. Эпителиоциты в большинстве со сферическими просветленными ядрами. Просветы канальцев свободные. Таким образом, ежедневное в течение двух недель пероральное введение крысам витамина D вызывает застой микроциркуляции в почках, с очагами кровоизлияний, гломеруло-тубулярным поражением воспалительного характера и наличием межуточного кальциноза.

Морфологическое исследование почек у крыс с гипокальциемией, созданное хирургическим удалением паращитовидных желёз (морфологические исследования у крыс с гипокальциемией, созданной двухнедельным введением миокальцика не выявили особых изменений), показало 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 накоплениями 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, экспериментальная гипокальциемия, способствует развитию в почках канальцевого и межуточного кальциноза с экссудативной гломерулопатией, острым канальцевым некрозом и интерстициальным нефритом.

Изучение морфологической характеристики почек крыс с почечной недостаточностью показало, что спустя одну неделю после введения крысам глицерина особых изменений, кроме незначительной разнокалиберности клубочков и застоя в сосудах, не было выявлено. А через две недели морфологическая картина почек стала в большей степени отличаться от нормы. Так, в сосудистом компоненте клубочков нефрона, на фоне прерывания капилляров, отмечались явления зияния их просветов и эритроцитарные стазы, а в отдельных клубочках имелись мелкие кровоизлияния. При этом просвет капсулы у большинства был свободен, хотя в отдельных местах встречались отеочно-набухшие мезангиальные клетки и эндотелий капилляров. Канальцевый аппарат был представлен клетками от нормальных до дистрофичных, степень изменений которых была выражена в широком диапазоне. Как в корковом, как и в мозговом отделах, особенно на границе между ними, выявлялись многочисленные разнокалиберные (от мелких до крупных) лимфоцитарные инфильтраты, а канальцы, соприкасающиеся с ними, имели в отдельных местах деструктивные изменения. В сосудистой системе отмечались как очаги кровоизлияний, так и явления слабо выраженного застоя, преимущественно в венах, а в просветах канальцев – белковые слепки, в отдельных местах – мелкие отложения кальция с явлениями межпочечного кальциноза.

В конце второго месяца в корковом и мозговом веществах стало больше различных лимфоцитарных инфильтратов, причем не только мелких, но и более крупных. Застой крови в венах также стал более выражен, а участки кровоизлияний диапедезного характера стали чаще. В канальцевом аппарате, особенно в его проксимальных отделах, отмечались диффузные дистрофические изменения с наличием в их просветах белково-гиалиновых слепков. Увеличились количество и площадь отложений кальция. В конце третьего месяца по сравнению с тем, что было месяцем ранее, особых изменений не произошло. Таким образом, трехкратное введение крысам глицерина в дозе 0,8 мл/100 г вызывает почечную недостаточность с картиной экссудативной гломерулопатии, интерстициального нефрита и канальцевой дистрофии.

О гиперкальциемии можно говорить только при повышении в плазме крови содержания кальция, который после недельного введения аквадетрима достоверное

($p < 0,05$) повысился с контрольной величины в $2,32 \pm 0,17$ ммоль/л до $2,95 \pm 0,21$ ммоль/л, а после двухнедельного введения – до $3,24 \pm 0,28$ ммоль/л ($p < 0,002$).

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 до $1,69 \pm 0,12$ ммоль/л ($p < 0,02$) через одну неделю и до $1,82 \pm 0,15$ ммоль/л ($p < 0,01$) в конце второй недели эксперимента.

Одновременно с нарушением постоянства кальция в крови отмечалось повышение содержания конечного продукта креатин-фосфатной реакции, и являющегося важным показателем работы почек – креатинина, который после введения аквадетрима в течение одной недели повысился на 12,9% ($p < 0,05$), а после двух недель еще больше – на 22,4% ($p < 0,002$). В то же время введение витамина D в течение одной недели не оказало выраженного влияния на содержание в плазме крови конечного продукта метаболизма белка – мочевины, но после двух недель ежедневного введения аквадетрима уровень мочевины в крови статистически значимо ($p < 0,05$) повысился на 40,4% от контрольного уровня. Практически без изменений оставался уровень общего белка в плазме крови как после недельного, так и двухнедельного введения аквадетрима.

По аналогии с гиперкальциемией о гипокальциемии можно говорить только при снижении в крови уровня общего кальция, которое через 1,5 месяца после удаления у крыс паращитовидных желёз по сравнению с нормой, равной $2,36 \pm 0,21$ ммоль/л стало меньше на 34,8% ($p < 0,05$), что для такого относительно постоянного показателя является значительным изменением. Одновременно отмечалось достоверное ($p < 0,001$) повышение в крови уровня неорганического фосфора с $1,42 \pm 0,09$ ммоль/л до $1,98 \pm 0,12$ ммоль/л.

Вызванная удалением паращитовидных желёз гипокальциемия не повлияла на уровень мочевины в крови, в то время, как на содержание общего белка оказала снижающее влияние и он стал меньше контроля на 25% ($p < 0,01$). Содержание креатинина в плазме крови, как одного из показателей нормальной работы почек,

было через полтора месяца после удаления паращитовидных желез повышено ($p<0,002$) с уровня контроля в $71,84\pm2,32$ мкмоль/л до $84,90\pm2,75$ мкмоль/л.

Так как процессы, протекающие в почках аэробны, и сопровождаются образованием токсических кислородных радикалов, то будет логичным посмотреть состояние перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в зависимости от различного уровня кальция. Активные формы кислорода вызывают накопление ионов кальция в цитоплазме, стимулируя фосфорилирование белков, а снижение или блокада их антиоксидантами уменьшает эффекты факторов роста клеток, цитокинов, инсулина, паратирин и витамина D₃.

При изучении влияния гиперкальциемии на перекисацию 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 ($9,16\pm0,38$ мкмоль/л, $p<0,001$) и в 1,94 раза малоновый диальдегид ($56,28\pm4,12$ мкмоль/л, $p<0,001$). То есть витамин D гиперкальциемия 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 перекисации.

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 ($p<0,002$). Снижение активности этого фермента может быть обусловлено тем, что повышенное содержание кальция, оказывает конкурирующее действие с цинком, находящимся в ферменте на уровне всасывания в кишечнике.

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

Изучение влияния гипокальциемии на перекисное окисление полиненасыщенных жирных кислот выявило усиление окислительной деградация липидов и уровень гидроперекисей с контрольной величины в $4,72\pm0,24$ мкмоль/л повысился на 63,7% ($p<0,001$). Увеличилось и содержания малонового диальдегида ($p<0,01$), но в процентном отношении по сравнению с гидроперекисями оно было в меньшей степени (на 46,8%). Одновременно с усилением пероксидации липидов гипокальциемия на антиоксидантную защиту клеток оказало ослабляющее действие, и активность супероксиддисмутазы (контроль – $69,62\pm2,28$ ед.ингибир., опыт – $50,05\pm2,48$ ед.ингибир., $p<0,001$) и каталазы (контроль – $7,20\pm0,25\cdot10^{-4}$ МЕ/г Нб, опыт – $4,71\pm0,25\cdot10^{-4}$ МЕ/г Нб, $p<0,001$) были снижены.

Проводя сравнение процессов перекисного окисления липидов и активности ферментов антиоксидантной системы в условиях гипер- и гипокальциемии можно отметить однонаправленные изменения – повышение пероксидации липидов и снижение антиоксидантной защиты.

При токсическом поражении почек в конце первой недели отмечалось, примерно равностепенное, усиление как пероксидации липидов, так и антиоксидантной защиты, но уже к концу второй недели начала преобладать окислительная деградация липидов, в результате чего содержание гидроперекисей ($p<0,001$) и малонового диальдегида ($p<0,01$) достоверно повысились, а выявленное в недельных опытах усиление антиоксидантной защиты, наоборот, стало меньше контроля, и активность супероксиддисмутазы стала слабее контроля ($p<0,01$), также как и каталазы, но она без достоверного отличия.

Очевидно, что усиление пероксидации липидов и ослабление антиоксидантной защиты связано с токсическим поражением почек и вероятным нарушением синтеза и секреции эритропоэтинов, и тем самым снижения интенсивности эритропоэза и количества эритроцитов.

Недельное введение аквадетрима крысам оказало активирующее влияние на количество эритроцитов в периферической крови и содержание гемоглобина, которые у контрольных крыс были $5,48 \pm 0,34 \cdot 10^{12}/л$ и $130,88 \pm 1,76$ г/л. Статистически значимые отличия эти показатели приобрели только после двухнедельного введения аквадетрима, когда концентрация эритроцитов в крови стала $7,39 \pm 0,47 \cdot 10^{12}/л$ ($p < 0,02$), а содержание гемоглобина достигло уровня в $148,70 \pm 3,52$ г/л ($p < 0,002$). То, что витамин D оказывает стимулирующее влияние на эритропоэз, но повышение количества эритроцитов в периферической крови стало только после двухнедельного введения аквадетрима, очевидно, обусловлено тем, что на 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.

Учитывая функцию кальция и его роль в выработке эритропоэтина мы предположили, что дефицит этого элемента не может, не отразится на гематологических показателях у крыс с экспериментальной паратиреоидэктомией. Проведенные исследования показали, что через полтора месяца после операции, когда у крыс полностью развивается гипокальциемия, содержание гемоглобина у этих животных было $112,98 \pm 1,06$ г/л, количество эритроцитов – $5,16 \pm 0,14 \cdot 10^{12}/л$, то есть имело место их достоверное снижение по сравнению с результатами контроля.

Таким образом, гипокальциемия приводит к снижению количества эритроцитов, гемоглобина и гематокрита, что, очевидно, связано с угнетением эритропоэза вследствие уменьшения синтеза эритропоэтина.

Снижение количества эритроцитов и содержания гемоглобина в крови крыс с почечной недостаточностью начало проявляться через одну неделю после введения глицерина, но достоверное отличие это приобрело в конце второй недели, но особенно в конце первого месяца, когда крысам ввели глицерин два раза. Сниженным эти показатели оставались и в конце второго и третьего месяцев. Когда ранее мы вводили крысам глицерин один раз, то в опытах, поставленных через один месяц количество эритроцитов и содержания гемоглобина начали повышаться, что также подтверждает факт того, что однократное введение нефротоксиканта вызывает изменения не столь продолжительные. Поэтому мы и вводили крысам глицерин три раза, что уже точно способствует развитию почечной недостаточности.

Так как и почечная недостаточность, и гипокальциемия, и гиперкальциемия приводят к снижению количества эритроцитов и содержания гемоглобина, то при их совместных состояниях, очевидно должно быть большее угнетение этих показателей. Действительно, проведенные исследования подтвердили это предположение и уже через две недели после инъекции глицерина у данной группы крыс уровень гемоглобина составил $88,55 \pm 1,78$ г/л, количество эритроцитов – $3,88 \pm 0,22 \cdot 10^{12}$ /л, а в исследованиях, проведенных через 1 месяц после двухкратного введения глицерина содержание гемоглобина снизилось до $80,45 \pm 1,05$ г/л, количество эритроцитов – до $3,64 \pm 0,08 \cdot 10^{12}$ /л. То есть, сочетание гипокальциемии и почечной недостаточности приводит к суммированию угнетающего эффекта на эритропоэз со снижением количества эритроцитов и содержания гемоглобина.

Спонтанный диурез у крыс через 1,5 месяца после паратиреоидэктомии статистически значимое ($p < 0,001$) повысился на 56%, что было обусловлено тем, что скорость клубочковой фильтрации незначительно ускорилась, но одновременно с этим имело место достоверное ($p < 0,001$) снижение канальцевой реабсорбции воды, что обеспечило примерно 50,0% повышения диуреза. Таким образом, гипокальциемия вызывает повышение спонтанного диуреза, за счёт достоверного снижения канальцевой реабсорбции воды. Влияние, оказываемое клубочковой фильтрацией на изменение диуреза незначительное, но также направлено на увеличение мочи.

Определение в слоях ткани почек (корковое и мозговое вещество, почечный сосочек) содержания осмотически активных веществ – мочевины и натрия через полтора месяца после удаления паращитовидных желёз и создания гипокальциемии выявило статистически достоверное снижение содержание мочевины во всех слоях почек. Уровень натрия – основного «создателя» осмолярности интерстиция почек, был достоверно меньше в корковом и мозговом веществе. Снижение даже одного натрия или мочевины, основных веществ, создающих осмолярность интерстиция, может повлиять на канальцевую реабсорбцию воды, а тем более, когда они оба меняются односторонне, что, естественно, будет в большей степени влиять на обратный транспорт воды. Возможно, это является одной из причин повышения диуреза у крыс после удаления у них паращитовидных желёз. К тому же снижение

содержания кальция в плазме крови, имеющееся у этих крыс, также должно способствовать уменьшению реабсорбции воды.

В отношении обмена мочевины после паратиреоидэктомии, можно отметить, что с самого начала до завершения экспериментов мы не наблюдали изменений в её экскреции и содержании в плазме крови. Таким образом, удаление у крыс паращитовидных желёз, приводящее к гипокальциемии, не оказывает влияние на экскрецию мочевины и её содержание в крови, но вызывают снижение содержания мочевины и натрия в слоях ткани почек, что уменьшает осмолярность ткани почек, способствует торможению канальцевой реабсорбции воды и повышению диуреза.

Введение аквадетрима вызвало создание гиперкальциемии и повысило содержание кальция в плазме крови, что на водовыделительную функцию почек оказало тормозящее влияние, и спонтанный диурез 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 после обусловлено только усилением ($p < 0,02$) обратного всасывания воды канальцах почек, так как скорость клубочковой фильтрации увеличилась на 14,0% и это не имело достоверного отличия, но с продолжением введения аквадетрима к, остающейся на прежнем повышенном уровне канальцевой реабсорбции воды, присоединилась уменьшение на 25,4% скорости клубочковой фильтрации, что и усилило снижения спонтанного диуреза. То есть при двухнедельном введении крысам аквадетрима изменения обоих основных процессов мочеобразования способствовали уменьшению спонтанного диуреза.

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, через одну неделю введения аквадетрима особых изменений не наблюдалось, но к концу второй недели отмечалось достоверное ($p < 0,002$) снижение объемной скорости кровотока.

Спонтанный диурез у крыс после введения глицерина также начал меняться: через одну неделю в сторону снижения ($p < 0,05$), а в конце второй недели, наоборот, произошло повышение ($p < 0,001$). Изменение было обусловлено тем, что в первую неделю скорость клубочковой фильтрации достоверно снизилась ($p < 0,001$), а

канальцевая реабсорбция воды осталась без изменений, т.е. снижение диуреза было обусловлено торможением гломерулярной фильтрации, а повышение диуреза через две недели уже было следствием и повышения скорости клубочковой фильтрации ($p<0,05$), и снижения ($p<0,001$) канальцевой реабсорбции воды. В месячных экспериментах отмечались максимальное повышение диуреза из-за ускорения клубочковой фильтрации ($p<0,001$) и одновременное снижение канальцевой реабсорбции воды ($p<0,001$), что и дало полиурический эффект с превышением контроля в 2,3 раза. В конце второго и третьего месяцев скорость клубочковой фильтрации практически нормализовалась, но диурез оставался повышенным, так как процесс обратного всасывания первичной мочи в канальцах нефронов оставался сниженным. При этом в плазме крови повышался уровень креатинина. Таким образом, водовыделительная функция почек у крыс с почечной недостаточностью проявляется непродолжительным снижением спонтанного диуреза и его повышением с полиурическим проявлением через один месяц.

Определение осмотического давления в слоях ткани почек по содержанию в них мочевины и натрия показало, что через 7 дней после инъекции глицерина особо не отличалось от контрольных данных. А раз электролитно-мочевинный профиль не менялся, то неизменным остаётся осмотическое давление и, соответственно, канальцевая реабсорбция воды, а отмеченное нами ранее снижение диуреза было обусловлено ослаблением скорости клубочковой фильтрации, а не изменением канальцевой реабсорбции. Спустя месяц с момента создания модели почечной недостаточности, когда у крыс отмечалась наиболее выраженная полиурия, обусловленная как ускорением клубочковой фильтрации, так и снижением канальцевой реабсорбции воды, содержание мочевины и натрия в ткани слоёв почек было меньше, чем у интактных крыс. Уровень мочевины в корковом веществе снизился ($p<0,01$), уменьшение натрия не имело достоверного отличия, в мозговом веществе и почечном сосочке снижение мочевины ($p<0,02$), и натрия ($p<0,01$) уже имели достоверное отличие. Эти изменения способствуют снижению осмотического давления и канальцевой реабсорбции воды, что и вызывает полиурию. При завершении экспериментов в конце третьего месяца в корковом веществе содержание мочевины и натрия не отличалось от нормы. В мозговом веществе и почечном сосочке уровень мочевины продолжал оставаться статистически значимо

сниженным, в то время как уровень натрия был соразмерен контролю. Однако при этом градиент содержания мочевины в слоях почек (меньше в корковом веществе, больше в мозговом и ещё больше в почечном сосочке) сохранялся.

Определение содержания мочевины в плазме крови выявило её повышение уже через две недели ($p < 0,01$), а дальше оно нарастало. Такое повышение уровня мочевины в крови может способствовать нарастанию её содержания в интерстициальной ткани, что также усиливается действием вазопрессина, способствующего выходу мочевины из собирательных трубочек в интерстиций. Экскреция мочевины уже с первой недели начала постепенно повышаться, с максимумом в конце первого месяца, а в конце второго месяца выведение мочевины с мочой стало близко к результату контроля, а к моменту завершения опытов, в конце третьего месяца, меньше ($p < 0,05$).

Таким образом, изменение спонтанного диуреза у крыс с почечной недостаточностью электролитно-мочевинный профиль слоёв ткани почек по содержанию мочевины и натрия в конце первого месяца снизился, что способствовало ослаблению в них осмотического давления и, соответственно, канальцевой реабсорбции воды, вызывая полиурию. При завершении экспериментов в конце третьего месяца содержание мочевины и натрия не отличалось от нормы.

Кальцитониновая гипокальциемия вызвала повышение спонтанного диуреза на 40,4% ($p < 0,002$) на 62,8% через одну и две недели введения гормона в результате как ускорение клубочковой фильтрации, так и снижение канальцевой реабсорбции воды. Однако основным фактором повышения диуреза являлось ускорение фильтрации (на 50,0% ($p < 0,002$) и на 64,3% ($p < 0,001$, соответственно). Эти изменения были обусловлены ускорением объемной скорости почечного кровотока.

При создании гипокальциемии на фоне токсического поражения почек водовыделительная функция почек отличалась от данных и при глицериновом поражении почек, и при гипокальциемии. В этом случае через одну неделю основные процессы мочеобразования не имели достоверного отличия от контроля, но по сравнению с результатами после введения глицерина, диурез и скорость клубочковой фильтрации у крыс стали в половину больше ($p < 0,001$), а по сравнению с гипокальциемическим состоянием – наоборот меньше ($p < 0,01$). Канальцевая реабсорбция не менялась. В двухнедельных опытах эта направленность изменений

диуреза и клубочковой фильтрации сохранилась и имела достоверные отличия от контроля. Содержания креатинина в плазме крови стало больше, чем при отдельном глицериновом поражении почек и при гипокальциемии. Аналогичное отличие наблюдалось и в степени протеинурии.

Исследование в слоях почек содержание мочевины и натрия, как основных осмотически активных веществ показало снижение содержания мочевины во всех слоях ткани почек, а натрия только в корковом и мозговом веществах.

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 вследствие уменьшения осмотического давления в интерстиций слоев 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.

Проводя параллель этих результатов водовыделительной функции почек при гиперкальциемии с ранее полученными данными в условиях экспериментальной гипокальциемии, вызванной удалением паращитовидных желез, можно отметить противоположное влияние на диурез, в результате снижения канальцевой реабсорбции воды. В то же время на усиление степени протеинурии оказывают одинаковое влияние.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Создание почечной недостаточности на крысах линии Вистар путем трёхкратного в/м введения 50,0 % раствора глицерина в дозе 0,8 мл/100г характеризуется протеинурией, снижением спонтанного диуреза в результате торможением объемной скорости почечного кровотока и ослабления клубочковой фильтрации.
2. Экспериментальная гипокальциемия, созданная путем оперативного удаления паращитовидных желёз, через полтора месяца вызывает в почках 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 отмечается гиперкреатининемия и протеинурия с повышением диуреза в результате торможения канальцевой реабсорбции воды.

3. Гипокальциемия, созданная ежедневным два раза в сутки введением кальцитонина (микальцика) в дозе 0,6 МЕ/100г также 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. Введение кальцитонина на фоне токсического поражения почек снимает, вызванное введением глицерина, торможение диуреза и угнетение скорости клубочковой фильтрации, но усиливает степень протеинурии.
4. Экспериментальная гиперкальциемия, вызванная ежедневным в течение двух недель, введением крысам витамина D (Аквадетрим) в дозе 10 тыс. МЕ/100г также вызывает протеинурию, снижение объемной скорости почечного кровотока, клубочковой фильтрации, усиление канальцевой реабсорбции воды и торможение 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.
5. Как гиперкальциемия, так и снижение содержания кальция в плазме крови на перекисное окисление липидов и активность антиоксидантной системы оказывают однонаправленные изменения – повышение пероксидации липидов и снижение антиоксидантной защиты.