

© Коллектив авторов, 2017
УДК 546.77:591.149.1
doi:

Гипокальциемия усиливает нефротоксические эффекты молибдата аммония

Брин В.Б., Меликова Э.Р.

ФГБОУ ВО СОГМА Минздрава России, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации; Россия, г. Владикавказ, ул. Пушкинская 40.

Цель исследования. Одним из патогенетических механизмов цитотоксического действия тяжелых металлов, является нарушение кальциевого гомеостаза. Кальций в организме может вступать во взаимоотношения с тяжелыми металлами и оказывать влияние на их метаболизм. В связи с этим целью исследования было изучение особенностей изменения функции почек при действии молибдена в условиях гипокальциемии. **Методы.** В эксперименте на крысах линии Вистар изучали влияние кальцитонина на почечные проявления интоксикации, вызванной введением молибдата аммония. Кальцитонин вводили ежедневно подкожно в дозе 0,6 ЕД/100 г массы тела в течение 20 дней, молибдат аммония вводили парентерально через час после инъекций кальцитонина в дозе 50 мг/кг (в пересчете на металл) 1 раз в сутки также в течение 20 дней. **Результаты.** Было обнаружено, что молибдат аммония вызывал более выраженные изменения функции почек в условиях гипокальциемии, в виде полиурии, обусловленной нарушением канальцевой реабсорбции воды, несмотря на уменьшение скорости клубочковой фильтрации. Одновременно наблюдали более выраженную протеинурию. Нарушение ионовывделительной функции почек проявлялось в уменьшении канальцевой реабсорбции натрия и усилении его выделения с мочой, при сниженном фильтрационном заряде. Экскреция и фильтрационная обработка калия увеличивались. Кальциурез увеличивался при пониженном фильтрационном заряде. Электролитный состав плазмы крови характеризовался гипонатриемией, гиперкальциемией и гиперкалиемией. **Заключение.** Гипокальциемия усиливает токсическое действие молибдата аммония на функцию почек.

Ключевые слова: гипокальциемия, кальцитонин, молибден, функция почек.

Для цитирования: Брин В.Б., Меликова Э.Р. Гипокальциемия усиливает нефротоксические эффекты молибдата аммония. Патогенез. 2017; 15(2): 57–61

Для корреспонденции: Брин Вадим Борисович, доктор мед. наук, проф. кафедры нормальной физиологии. e-mail: vbbbrin@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 27.10.2016

Hypocalcemia increases the nephrotoxic effects of ammonium molybdate

Brin V.B, Melikova E.R.

FSBEI HE NOSMA MOH Russia, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «North-Ossetian State Medical Academy» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Russia, Vladikavkaz, Pushkinskaya st., 40

Objective. One of the pathogenic mechanisms of heavy metals cytotoxic action is the disruption of calcium homeostasis. The calcium in the body may take part in competitive relationship with heavy metals and influence on their metabolism. In this regard, the aim of the research was to study the peculiarities of renal function changes under the action of molybdenum in conditions of hypocalcemia models. **Methods.** In the experiment on Wistar rats the effect of calcitonin on the renal manifestations of intoxication caused by the introduction of ammonium molybdate was investigated. Calcitonin was injected daily subcutaneously at a dosage of 0.6 U/100 g body weight for 20 days, an hour later calcitonin injection ammonium molybdate was administered parenterally at a dosage of 50 mg/kg (in recalculation on metal) 1 time per day. At the end of the experiment animals were killed under thiopental anesthesia. **Results.** It was found that ammonium molybdate caused more pronounced changes in renal function under conditions of hypocalcemia in the form of polyuria due to the reduced tubular reabsorption of water, despite of the decrease in glomerular filtration rate. At the same time more pronounced proteinuria was noted. The study ion-excretory renal function showed the reduction of sodium tubular reabsorption and its increased urinary excretion, at a reduced filtration charge. Excretion and filtration of potassium was increased. Calciuresis was increased with reduced filtration charge. Electrolyte composition of blood plasma was characterized by low sodium and high calcium and potassium levels. **Conclusion.** The study revealed that hypocalcemia enhanced the toxic effect of ammonium molybdate on renal function.

Keywords: hypocalcemia, calcitonin, molybdenum, renal function.

For citation: Brin V.B, Melikova E.R. Hypocalcemia increases the nephrotoxic effects of ammonium molybdate. Pathogenesis. 2017; 15(2): 57–61 (In Russian).

For correspondence: Brin Vadim Borisovich, doctor of medical sciences. Professor, e-mail: vbbrin@yandex.ru
Funding. The study had no sponsorship.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.
Received 27.10.2016

Введение

Молибден относится к жизненно необходимым микроэлементам, однако его избыточное поступление в организм оказывает токсическое действие. Выведение ксенобиотика в основном идет через почки, при этом повышенное содержание металла в моче и крови оказывает токсическое влияние на функцию органа [1, 2]. Также известно, что уровень ионизированного кальция может оказывать влияние на метаболизм тяжелых металлов в организме [3–8], что придает актуальность проблеме изучения влияния тяжелых металлов на почечные функции в условиях измененного кальциевого гомеостаза. Ранее было показано, что экспериментальная гипокальциемия усугубляет повреждающие эффекты сульфата кадмия [5] и ацетата свинца [3]. Введение хлорида кобальта крысам на фоне гипопаратиреоза способствовало приросту уровня спонтанного диуреза за счёт угнетения канальцевой реабсорбции воды, увеличения экскреции кальция и натрия с мочой, выявлялась протеинурия [4]. Введение ртути, кобальта на фоне кальцитониновой гипокальциемии усиливают выраженность нефропатии. Влияние молибдена на функцию почек в условиях измененного кальциевого гомеостаза практически не изучалось.

Целью данной работы было изучение особенностей изменения функции почек при действии молибдена в условиях гипокальциемии.

Методика

Исследование проведено на крысах-самцах линии Вистар, массой 200–260 г. Животные были разделены на 4 группы: 1-я группа — интактные животные; 2-я группа — крысы с введением кальцитонина (КТ) ежедневно (0,6 ЕД/100 г, п/к) в течение 20 дней; 3-я группа — крысы с введением молибдата аммония подкожно в дозе 50 мг/кг (в пересчете на металл) 1 раз в сутки также в течение 20 дней, 4-я группа — крысы с введением молибдата аммония (МА) через час после инъекции кальцитонина (на высоте гипокальциемии) в указанных дозах (группа КТ+МА).

По истечении введения животных забивали под тиопенталовым наркозом. Работа выполнялась с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинской декларации, в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Для сбора мочи животных помещали в обменные клетки на 6 часов. Определяли объем спонтанного диуреза, скорость клубочковой фильтрации (СКФ) по клиренсу эндогенного креатинина, рассчитывали канальцевую реабсорбцию воды. Содержание Na и K в моче и плазме определяли методом пламенной фотометрии, с помощью пламенного анализатора жидкостей ПФА-378, концентрацию кальция, креатинина, белка определяли спектрофотометрически на спектрофотометре PV 1251C с помощью наборов «Кальций-Арсеназо-Агат», «Креати-

нин-Агат», ООО «Агат-Мед» (г.Москва, Россия.) Образцы ткани почек фиксировали в 10% нейтральном формалине, затем заливали в парафин с последующим приготвлением срезов толщиной 5–6 микрон. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином и изучали в проходящем свете при помощи микроскопа PrimoStarZeiss с цифровой камерой AxioCamERc 5s.

Полученные данные обрабатывали статистически с применением параметрического метода сравнения средних величин с помощью t-критерия Стьюдента, учитывая количество выборок и нормальное распределение рядов сравнения, установленное с помощью критерия Шапиро—Уилка ($W_{ф} > W_{м}$). Для расчетов и построения графиков были использованы программы Microsoft Excel 2015 и «Prizma5.03».

Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, молибдат аммония увеличивал 6-часовой спонтанный диурез по сравнению с интактными крысами, что было связано с уменьшением относительной канальцевой реабсорбции воды, несмотря на пониженную скорость клубочковой фильтрации (СКФ). При этом наблюдалась заметная протеинурия при уменьшении осмотического давления мочи (рис. 1). При изучении ионовывделительной функции почек отмечалось усиление экскреции натрия по сравнению с интактными крысами. Причиной натриуреза было нарушение канальцевой реабсорбции, в то время как фильтрационный заряд уменьшался вследствие уменьшения СКФ. В плазме крови отмечалась гипонатриемия (табл. 2). Калиурез увеличивался относительно показателей интактных крыс, вследствие увеличения его фильтрационный заряд. В плазме крови уровень калия повышался (табл. 3). Экскреция кальция с мочой повышалась относительно уровня интактной группы крыс, что было обусловлено ослаблением его канальцевой реабсорбции. Фильтрационный заряд, вследствие торможения СКФ уменьшался, а содержание кальция в плазме крови, несмотря на повышение экскреции кальция увеличивалось (табл. 4), что, вероятно, в условиях неизменного уровня поступления в организм экспериментальных животных кальция с пищей можно объяснить пополнением кальция из костной ткани [1, 7, 8].

У крыс, получавших инъекции кальцитонина, увеличивался объем 6-часового спонтанного диуреза, в этом случае полиурия была следствием увеличения СКФ, а также уменьшения канальцевой реабсорбции воды (табл. 1). При введении кальцитонина способность к осмотическому концентрированию мочи уменьшалась ($<0,001$), а экскреция белка не претерпевала изменений относительно интактной группы. Экскреции натрия и его фильтрационный заряд увеличивались, в то время как в плазме крови регистрировали гипонатриемию (табл. 2). При этом относительная канальцевая реабсорбция данного катиона оставалась в пределах интактных показателей. Экскреция калия и его фильтрационный заряд увеличивались, а в плазме крови уровень калия

был понижен (табл. 3). Кальцитонин сам по себе увеличивал экскрецию кальция с мочой, так как его реабсорбция уменьшалась, а в крови наблюдалась гипокальциемия (табл. 4).

Введение молибдата аммония на фоне инъекций кальцитонина (группа КТ+МА), приводило к выраженной полиурической реакции вследствие нарушения канальцевой реабсорбции воды, несмотря на уменьшение СКФ. Сопоставление объема диуреза и канальцевой реабсорбции воды в группе КТ+МА и у крыс, инъектированных МА, выявило достоверно более значимые изменения в условиях кальцитониновой гипокальциемии (табл. 1). Способность к осмотическому концентрированию мочи падала ($<0,001$) в обеих сравниваемых группах, но в наибольшей степени при комбинации кальцитонина с молибденом. В этой же группе была самая высокая протеинурия (рис. 1). Натрийурез у этих крыс был выше значений интактной группы крыс и отмечалась тенденция к повышению по сравнению с изолированной молибденовой интоксикацией. В обеих группах с введением молибдата аммония фильтрационный заряд натрия уменьшался, но без достоверных различий между группами. В группе КТ+МА относительная канальцевая реабсорбция натрия и уровень натрия в плазме крови уменьшались в большей степени, чем при введении только молибдена (табл. 2). Наиболее выраженный калийурез в этой группе был следствием роста фильтрационного заряда катиона, при этом концентрация калия в крови увеличивалась (табл. 3). Аналогичные изменения СКФ отмечались и в группе с введением только молибден, но достоверных отличий между группами здесь не выявлялось. Вероятно, в сочетанной модели изменялись более существенно другие процессы — реабсорбция и секреция калия.

При гистологическом исследовании почек в группе с введением молибдата аммония интактным животным отмечалось сморщивание капилляров клубочков, расширение полости капсулы Боумена—Шумлянского. Выявлялся некроз эпителия отдельных канальцев и гидропическая дистрофия (рис. 2).

При введении молибдата аммония на фоне инъекций кальцитонина выявлялись изменения тканей почек в виде более выраженных альтеративных изменений, которые помимо вышеописанных, характеризовались тотальным некрозом отдельных почечных каналь-

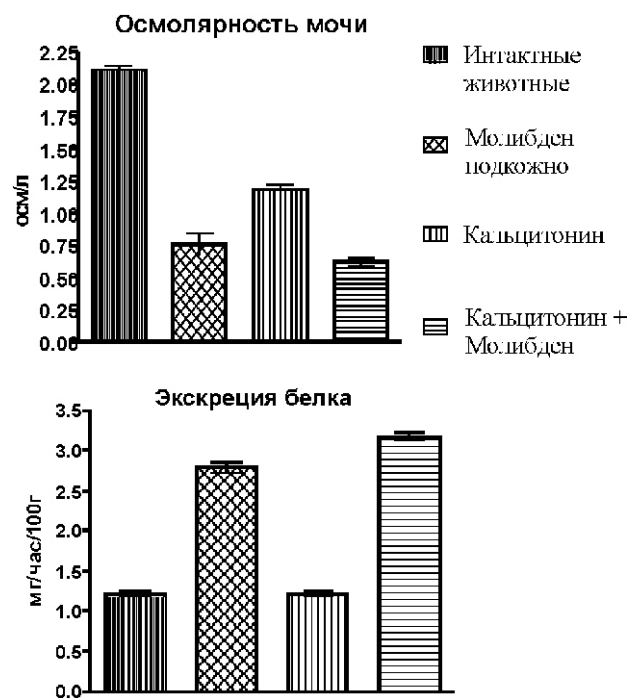


Рис. 1. Изменения осмолярности мочи и экскреции белка у крыс при введении молибдата аммония на фоне гипокальциемии в условиях спонтанного диуреза.

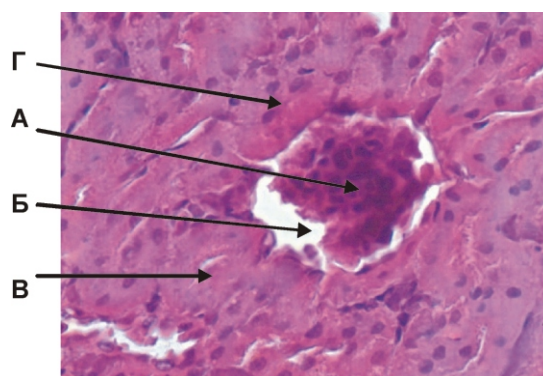


Рис. 2. Гистологическая картина почек крыс с введением молибдата аммония. Отмечается сморщивание капилляров клубочков (А), расширение полости капсулы Боумена—Шумлянского (Б), некроз эпителия отдельных канальцев (В), гидропическая дистрофия (Г). Окраска гематоксилин-эозин, увеличение $\times 200$.

Таблица 1

Основные процессы мочеобразования у крыс при токсикозе, вызванном введением молибдена на фоне гипокальциемии

| Серии опытов | Статистика | Процессы мочеобразования | | |
|------------------------|----------------|--------------------------|-------------------|----------------------|
| | | Диурез, мл/час/100 г | СКФ, мл/час/100 г | R H ₂ O % |
| Интактные животные | M ± m | 0,06 ± 0,004 | 17,94 ± 0,57 | 99,6 ± 0,036 |
| Молибден | M ± m | 0,14 ± 0,006 | 14,72 ± 0,45 | 99,0 ± 0,033 |
| | p ₁ | <0,001 | <0,05 | <0,001 |
| Кальцитонин | M ± m | 0,13 ± 0,005 | 22,2 ± 0,69 | 99,4 ± 0,052 |
| | p ₁ | <0,001 | <0,001 | <0,01 |
| Кальцитонин + молибден | M ± m | 0,17 ± 0,005 | 16,05 ± 0,44 | 98,9 ± 0,031 |
| | p ₁ | <0,001 | <0,05 | <0,001 |
| | p ₂ | <0,01 | <0,05 | <0,05 |

Примечание. СКФ — скорость клубочковой фильтрации; R_{H₂O} — канальцевая реабсорбция воды; p₁ — достоверность по сравнению с интактными животными; p₂ — достоверность по сравнению с группой «Молибден»

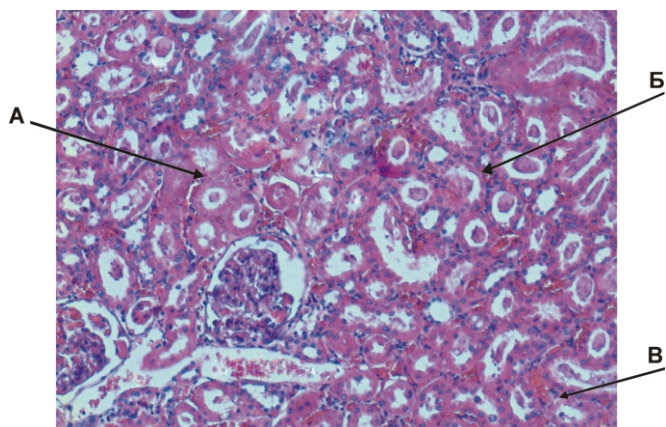


Рис. 3. Гистологическая картина почек крыс с введением молибдата аммония на фоне инъекций кальцитонина. Отмечается тотальный некроз отдельных почечных канальцев (А), выявляются белковые массы в просветах канальцев (Б), участки диапедезных кровоизлияний в паренхиме почек (В). Окраска гематоксилин-эозин х150.

цев. В просветах канальцев выявлялись белковые массы и участки диапедезных кровоизлияний в паренхиме почек (рис. 3).

Гистологическая картина нефропатии у крыс сочетанной модели была выражена существенно больше, чем при введении одного молибдена: кальцитонин потенцирует поражающее действие молибдена на почки.

Важно отметить, что ранее нами были показаны сходные нарушения функции и структуры почек при парентеральном введении молибдата аммония также на фоне гипокальциемии, вызванной экспериментальным гипопаратиреозом [9].

Заключение

Таким образом гипокальциемия потенцирует нефротоксический эффект молибдена, который выражается в увеличении спонтанного диуреза вследствие еще большего нарушения канальцевой реабсорбции воды, в увеличении протеинурии, активации экскреции электролитов, что приводит к нарастанию гипокальциемии и гипонатриемии.

Список литературы

1. Албегова Ж.К., Брин В.Б., Гаглоева Э.М., Закс Т.В. Почечные проявления хронической молибденовой интоксикации. *Вестник международной академии наук экологии и безопасности жизнедеятельности*. 2010;15 (4):85-88.
2. Pandey R., Kumar R. Molybdenum toxicity. *Human & Experimental Toxicology*. 2009:33-35.

Таблица 2

Изменение почечного транспорта натрия и его содержания в плазме крови при токсикозе, вызванном введением молибдена на фоне гипокальциемии

| Условия опыта | Статистика | E_{Na} | FZ_{Na} | R_{Na} | P_{Na} ммоль/л |
|------------------------|------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| Интактные животные | $M \pm m$ | $8,5 \pm 0,34$ | $2440 \pm 98,4$ | $99,6 \pm 0,03$ | $143,2 \pm 0,21$ |
| Молибден | $M \pm m$ | $11,0 \pm 0,52$ | $1919 \pm 62,3$ | $99,4 \pm 0,05$ | $137,2 \pm 1,27$ |
| | p_1 | $<0,01$ | $<0,001$ | $<0,01$ | $<0,05$ |
| Кальцитонин | $M \pm m$ | $9,8 \pm 0,49$ | $2916 \pm 58,3$ | $99,7 \pm 0,06$ | $138,0 \pm 1,89$ |
| | p_1 | $<0,001$ | $<0,001$ | — | $<0,01$ |
| Кальцитонин + молибден | $M \pm m$ | $14,8 \pm 0,69$ | $1983 \pm 69,2$ | $99,2 \pm 0,07$ | $130,0 \pm 0,88$ |
| | p_1 | $<0,001$ | $<0,01$ | $<0,001$ | $<0,001$ |
| | p_2 | $<0,001$ | — | — | $<0,01$ |

Примечание. E_{Na} — экскреция натрия, FZ_{Na} — фильтрационный заряд натрия, R_{Na} — реабсорбция натрия, P_{Na} — концентрация натрия в плазме крови; p_1 — достоверность по сравнению с интактными животными; p_2 — достоверность по сравнению с группой «Молибден»

Таблица 3

Почечный транспорт калия и его содержание в плазме крови при токсикозе, вызванном введением молибдена на гипокальциемии

| Серии опытов | Статистика | E_K | FZ_K | P_K ммоль/л |
|------------------------|------------|-----------------|------------------|------------------|
| Интактные животные | $M \pm m$ | $5,32 \pm 0,27$ | $78,41 \pm 2,49$ | $4,60 \pm 0,211$ |
| Молибден | $M \pm m$ | $6,34 \pm 0,54$ | $86,95 \pm 3,17$ | $6,22 \pm 0,191$ |
| | p_1 | $<0,01$ | $<0,05$ | $<0,001$ |
| Кальцитонин | $M \pm m$ | $6,25 \pm 0,33$ | $86,42 \pm 2,57$ | $4,09 \pm 0,112$ |
| | p_1 | $<0,05$ | $<0,05$ | $<0,05$ |
| Кальцитонин + молибден | $M \pm m$ | $7,84 \pm 0,42$ | $85,58 \pm 2,36$ | $5,61 \pm 0,172$ |
| | p_1 | $<0,001$ | $<0,05$ | $<0,01$ |
| | p_2 | $<0,001$ | — | $<0,05$ |

Примечание. E_K — экскреция калия, FZ_K — фильтрационный заряд калия, P_K — концентрация калия в плазме крови; p_1 — достоверность по сравнению с интактными животными; p_2 — достоверность по сравнению с группой «Молибден»

**Почечный транспорт кальция и его уровень в плазме крови
при токсикозе, вызванном введением молибдена на фоне гипокальциемии**

| Серии опытов | Статистика | \bar{X}_{Ca} | ΦZ_{Ca} | R_{Ca} | P_{Ca} ммоль/л |
|------------------------|------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|
| Интактные животные | $M \pm m$ | $0,14 \pm 0,004$ | $25,7 \pm 0,84$ | $99,4 \pm 0,042$ | $2,2 \pm 0,041$ |
| Молибден | $M \pm m$ | $0,20 \pm 0,006$ | $22,6 \pm 0,62$ | $99,1 \pm 0,092$ | $2,4 \pm 0,045$ |
| | p_1 | $<0,001$ | $<0,01$ | $<0,01$ | $<0,05$ |
| Кальцитонин | $M \pm m$ | $0,24 \pm 0,005$ | $26,1 \pm 0,83$ | $99,0 \pm 0,046$ | $1,8 \pm 0,056$ |
| | p_1 | $<0,001$ | — | $<0,001$ | $<0,001$ |
| Молибден + кальцитонин | $M \pm m$ | $0,28 \pm 0,007$ | $22,0 \pm 0,83$ | $98,7 \pm 0,052$ | $2,1 \pm 0,059$ |
| | p_1 | $<0,001$ | $<0,01$ | $<0,001$ | — |
| | p_2 | $<0,001$ | — | $<0,001$ | $<0,01$ |

Примечание. \bar{X}_{Ca} — экскреция кальция, ΦZ_{Ca} — фильтрационный заряд кальция, R_{Ca} — реабсорбция кальция, P_{Ca} — концентрация кальция в плазме крови; p_1 — достоверность по сравнению с интактными животными; p_2 — достоверность по сравнению с группой «Молибден».

3. Брин В.Б., Ахполова В.О. Влияние кальцитонина на нефротоксичность ацетата свинца. *Владикавказский медико — биологический вестник*. 2011;12: 47-50.

4. Бузоева М.Р., Брин В.Б. Сравнительное изучение ренальных эффектов хлорида кобальта в условиях измененного гомеостаза кальция. *Вестник МАНЭБ*. 2010;15(4):88-90.

5. Брин В.Б., Ахполова В.О., Бузоева М.Р., Хадартцева М.П. Влияние изменений кальциевого гомеостаза на нефротоксичность металлов. *Физиология и медицина. Высокие технологии: теория, практика. Сб. статей 5-й Междуна. научно-практической конференции*. Санкт-Петербург, Из-во Политехнич. университета. 2013; 2:27-34.

6. Цаллаева Р.Т., Брин В.Б. Эффекты хлорида цинка на функцию почек у паратиреоидэктомизированных крыс. *Вестник новых медицинских технологий* 2013; 2(20):375-7.

7. Ершов Ю.А., Плетнева Т.В. *Механизмы токсического действия неорганических соединений*. М.: Медицина. 1989;131-134,158-164, 280с.

8. Скальный А.В. *Химические элементы в физиологии и экологии человека*. М.: Издательский дом «ОНИКС 21 век»: Мир; 2004; 25-31;123 с.

9. Брин В.Б., Меликова Э.Р. Влияние подкожного и внутрижелудочного введения молибдата аммония на водовыделительную и электролитовыделительную функцию почек при экспериментальном гипопаратиреозе. *Вестник новых медицинских технологий*. 2015; 4(22): 111- 6.

References

1. Albegova J.K. Brin V.B., Gagloeva E.M., Zaks T.V. Renal manifestations of chronic molybdenum intoxication. *Vestnik mezhdunarodnoi akademii nauk ekologii i bezopasnosti zhiznedeyatelnosti*. 2010;15(4):85-88.(in Russian)

2. Pandey R., Kumar. R. Molybdenum toxicity. *Human & Experimental Toxicology*.2009:33-35.

3. Brin V.B., Ahpolova V.O. The influence of calcitonin on the lead acetate nephrotoxicity. *Vladikavkazskii mediko — biologicheskii vestnik*. 2011; 12:47-50. (in Russian)

4. Buzoeva M.R., Brin V.B. A comparative study of cobalt chloride renal effects in altered homeostasis of calcium. *Vestnik MANEB*.2010;15(4):88-90. (in Russian)

5. Brin V.B., Akhpolova V.O., Buzoeva M.R., Khadartseva M.P. Effect of changes in calcium homeostasis on the nephrotoxicity of metals. *Physiology and medicine. High technology: theory, practice. Sat. Articles of the 5th International. Scientific and practical conference*. St. Petersburg, From the Polytechnic University, 2013; 2:27-34. (in Russian)

6. Tsallaeva R.T., Brin V.B. Effects of zinc chloride on renal function of parathyroidectomized rats. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologii*. 2013;2 (20):375-7.(in Russian)

7. Ershov YU.A., Pletneva T.V. *Mekhanisms of inorganic compoundstoxic action*. M. Meditsina. 1989;131-134,158-164, 280s. (in Russian)

8. Skalnyi A.V. *Chemical elements in physiology and human ecology*. M.: Izdatelskiy dom «ONIKS 21 vek»: Mir. 2004; 25-31; 123 s. (in Russian).

9. Brin VB, Melikova E.R. Influence of subcutaneous and intragastric administration of ammonium molybdate on water-discharge and electrolyte excretory function of the kidneys under experimental hypoparathyroidism. *Bulletin of New Medical Technologies*. 2015; 4(22): 111-6. (in Russian)

Сведения об авторах:

Брин Вадим Борисович (Brin V.B.), доктор мед. наук, профессор, e-mail: vbbrin@yandex.ru
Меликова Элионора Роландовна (Melikova E.R.), ст.лаборант, e-mail: ella-melikova@mail.ru