 Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ’Я УКРАЇНИ

ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

КАРЧАУСКАС Віталій Юстінасович

УДК 616.61-008.64:616-005.1-08

ПАТОФІЗІОЛОГІЯ НИРОК І ОСМОТИЧНОГО ГОМЕОСТАЗУ   
ЗА УМОВ КАДМІЄВОЇ НЕФРОПАТІЇ

14.03.04 – патологічна фізіологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

дисертації на здобуття наукового ступеня   
кандидата медичних наук

Одеса – 2009

Дисертація є рукопис.

Робота виконана в Одеському державному медичному університеті МОЗ України.

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор,

заслужений діяч науки та техніки України,

*ГОЖЕНКО Анатолій Іванович,*

ДП Український НДІ медицини транспорту МОЗ України, м. Одеса, директор

**Офіційні опоненти:** доктор медичних наук, професор,

заслужений діяч науки та техніки України,

**СЕРВЕЦЬКИЙ Костянтин Леонідович,**

Одеський державний медичний університет МОЗ України, м. Одеса, завідувач кафедри інфекційних хвороб з епідеміологією

доктор медичних наук, професор,

*РОГОВИЙ Юрій Євгенович,*

Буковинський державний медичний університет МОЗ України, м. Чернівці, завідувач кафедри патологічної фізіології

Захист дисертації відбудеться “10” червня 2009 року о 13 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 41.600.01 при Одеському державному медичному університеті (65082, м. Одеса, пров. Валіховський, 2)

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Одеського державного медичного університету (65082, м. Одеса, пров. Валіховський, 3).

Автореферат розісланий “8” травня 2009 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради

д.мед.н., професор В.В.Годован

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** За даними літератури порушення параметрів водно-сольового обміну, які викликані дією дихлорида кадмію, є головним патогенетичним механізмом, що обумовлює низку порушень фізіологічних функцій організму людини, а саме, стан гемодинаміки, бронхо-легеневої та центральної нервової систем [Erkilic A.B. et al., 2006; Ando Y. et al., 2006; Kilburn K.H., McKinley K.L., 2007]. При цьому слід зазначити, що органи сечостатевої системи найбільш чутливі до впливу тяжких металів – ртуті та кадмію [Droller M.J., 2006].

Актуальність дослідження нефротоксичних ефектів кадмія обумовлена тим, що даний ксенобіотик один з найрозповсюджених в оточуючому середовищі і є одним з найбільш небезпечних токсичних речовин [Meo S.A., Al-Khlaiwi T., 2003; Waalkes M.P., 2003]. Встановлено, що іони кадмію накопичуються в тканинах нирок, чим безпосередньо й обумовлюється його нефротоксична дія [Мельничук Д.О. та ін., 2004]. Доведено, що нирковий кліренс іонів кадмію є одним з головних шляхів виведення сполук металу із організму [Horng C.J. et al., 2003]. У високо розвинутих країнах Європи темпи потрапляння іонів кадмію з продуктами харчування та питною водою в середньому складає приблизно 10 мкг/добу [Vahteristo L. et al., 2003]. Показано, що рівень кадмію в плазмі крові позитивно корелює з величиною протеінурії [Alfven T. et al., 2002]. Відомо, що хронічне надходження солей тяжким металів (в тому числі і кадмію) до організму людини викликає дозозалежні зміни функціонального стану нирок, що дозволяє рекомендувати клінічні дослідження діяльності нирок в якості скрининг-методу для визначення темпів накопичення важких металів в органах та тканинах [Price R.G. et al., 2006]. Показано, що солі кадмію, які вмістяться у продуктах харчування та воді, викликають суттєве підвищення концентрації креатині ну плазми крові та зниження показників ниркового кліренсу даної речовини [Aoshima K. et al., 2005].

Більшість дослідників дотримуються думки, що індукована кадмієм дисфункція канальцевого відділу нефрона є одним з основних патогенетичних механізмів ниркової недостатності [Diamond G.L. et al., 2003]. Такі спостереження є обґрунтуванням діагностичних критеріїв в оцінці тяжкості перебігу кадмій-індукованих ренальних дисфункцій, основаних на аналізі ниркових втрат білків плазми крові [Honda R. et al., 2003].

Поряд з цим, існують окремі повідомлення про те, що гострі отруєння дихлоридом кадмію супроводжуються не тільки пошкодженням канальцевого епітелію, а й виразним зниженням швидкості клубочкової фільтрації [Wittman R., Hu H., 2002]. Окрім того, відповідно до даних літератури, вивчення резервних можливостей нирок є перспективним напрямком в сучасній нефрології, який забезпечує надійну ранню діагностику ниркової недостатності токсичного генезу в гострий та підгострий періоди захворювання [Возіанов О.Ф., Гоженко А.І., Федорук О.С., 2003; Гоженко А.І., 2008].

Вищевикладені положення є основою для вивчення діяльності нирок щурів в умовах одноразового введення різних доз дихлорида кадмію в гострий та підгострий періоди інтоксикації дихлоридом кадмію [Гоженко А.И. и др., 2006-2008].

**Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана відповідно до плану науково-дослідних робіт Одеського державного медичного університету (ОДМУ) і є фрагментом теми “Молекулярно-генетичні та екологозалежні механізми розвитку пухлин репродуктивної системи: шляхи удосконалення діагностики, лікування і профілактики (№ держреєстрації 0102U006588). Дисертант є співвиконавцем зазначеної теми.

**Мета і задачі дослідження.** Мета дослідження – визначення патогенетичних механізмів гострого та підгострого періоду кадмій-індукованої нефропатії на підставі вивчення особливостей осморегулюючої функції нирок і стану ниркового функціонального резерву в білих щурів.

*Задачі дослідження:*

1. Вивчити особливості морфо-функціональних показників стану нирок білих щурів через 2 доби після одноразового введення дихлорида кадмію дозою 0,1 мг/кг ваги тіла.

2. З’ясувати особливості морфо-функціональних показників стану нирок білих щурів через 7 діб після одноразового введення дихлорида кадмію дозою 0,1 мг/кг ваги тіла.

3. Встановити особливості морфо-функціональних показників стану нирок білих щурів через 2 доби після одноразового введення дихлорида кадмію дозою 1 мг/кг ваги тіла.

4. Дослідити особливості морфо-функціональних показників стану нирок білих щурів через 7 діб після одноразового введення дихлорида кадмію дозою 1 мг/кг ваги тіла.

5. Визначити стан осморегулюючої функції та ниркового функціонального резерву нирок щурів, які підлягали дії вказаних доз дихлорида кадмію в гострий та підгострий періоди токсичного впливу.

*Об’єкт дослідження* – функціональний стан нирок та структурні особливості ниркової тканини при кадмієвій нефропатії

*Предмет дослідження* – патогенетичні механізми змін функціонального та морфологічного стану нирок щурів при кадмієвій нефропатії за умов індукованого діурезу.

*Методи дослідження* – в роботі використовували патофізіологічні, біохімічні, гістологічні методи дослідження функціонального та морфологічного стану нирок, статистичні.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше показано, що стан ниркового функціонального резерву об’єктивно відображає дозозалежні порушення діяльності нирок в гострий період кадмієвої інтоксикації організму, а також функціональний стан органа в підгострий період перебігу кадмій-індукованої ниркової недостатності.

Доказано, що відновлення ниркового функціонального резерву в підгострий період ниркової недостатності, яка індукована введенням солі кадмію в дозі 0,1 мг/кг ваги тіла, є надійним маркером позитивної динаміки перебігу захворювання. Вперше показано, що введення щурам дихлорида кадмію в дозі 1 мг/кг ваги тіла супроводжується зниженням ниркового функціонального резерву та зменшенням швидкості клубочкової фільтрації з підвищенням ниркових втрат білка і осмотично активних речовин протягом всього періода дослідження. Встановлено, що в підгострий період перебігу кадмієвої нефропатії, яка викликана введенням солі кадмію в дозі 1 мг/кг маси тіла, реєструється подальше посилення маніфестації ренальних дисфункцій, які проявляються в зниженні швидкості клубочкової фільтрації, відсутності ниркового функціонального резерву, підвищенні протеїнурії та порушенні осморегулюючої функції.

Вперше показано, що дозозалежне зниження величин кліренса креатиніну і величини ниркового функціонального резерву в умовах кадмієвої інтоксикації організму поєднується зі зменшенням ниркового кліренсу основного хімічно стабільного метаболіта молекули оксида азоту – нітрат-аніона ендогенного походження.

**Практичне значення одержаних результатів.** Отримані результати дослідження представляють важливу інформацію про патофізіологічні механізми виникнення і перебігу ниркової недостатності, яка викликана надходженням солі кадмію до організму. Співставлення динаміки ознак дисфункцій канальцієвого відділу нефрона (наявність ниркових втрат білка і осмотично активних речовин) і судинно-клубочкового апарату вказує, що зниження кліренсу креатиніну і ниркового функціонального резерву є надійними маркерами ступеню пошкодження тканини нирок в гострий період інтоксикації солями кадмію, а також достатньо об’єктивно відображають темпи відновлення діяльності органа у віддалені строки перебігу ниркової недостатності токсичного генезу. Показано, що вивчення динаміки ниркового кліренса ендогених нитратів, наряду з моніторингом протеінурії та ниркового функціонального резерву, може бути рекомендовано в якості діагностичних критеріїв при дослідженнях функціонального стану нирок в умовах кадмієвої інтоксикації організму.

Результати роботи впроваджені в навчальний процес на кафедрі загальної та клінічної патофізіології ім. В.В. Підвисоцького Одеського державного медичного університету, на кафедрах патологічної фізіології Тернопільського державного медичного університету, Харківського національного медичного університету, Кримського державного медичного університету ім. С.І. Георгієвського, Дніпропетровської державної медичної академії.

**Особистий внесок здобувача.** Автором особисто проведено патентно-інформаційний пошук, обґрунтовання схем дослідження, вибір і налагоджування експериментальних моделей, вибір обсягів та методів дослідження. Дисертантом самостійно проведені біохімічні та морфологічні дослідження, статистична оброботка, аналіз, узагальнення та інтерпретація отриманих даних; сформульовані основні положення і висновки дисертації.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення та висновки дисертаційної роботи були оприлюднені та отримали позитивну оцінку на наукових конференціях “V, VI читання ім. В.В. Підвисоцького” (Одеса, 2006, 2007), симпозіумі “Патогенетичні механізми токсичних нефропатій” (Одеса, 2006), пленумі патофізіологів України з міжнародною участю „Фундаментальні аспекти сучасної медицини” (Сімферополь, 2006), ІІІ Міжнародній науково-практичній конференції „Гомеостаз: фізіологія, патологія, фармакологія і клініка” (Одеса, 2007).

**Публікації**. За матеріалами дисертації опубликовано 11 наукових праць, з них 6 наукових статей у фахових журналах (з них 3, рекомендованих ВАК України), 5 тез доповідей у матеріалах та збірниках конференцій і конгресів.

**Об’єм та структура дисертації.** Дисертаційну роботу викладено на 132 сторінках комп’ютерного тексту. Вона складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, 3 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків. Текст дисертації проілюстровано 32 таблицями і 13 рисунками. Список літератури містить 201 джерело, з них 172 – іноземні.

**ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

## Матеріали та методи досліджень. **Експериментальні дослідження проведені на кафедрі загальної та клінічної патологічної фізіології ОДМУ із дотриманням вимог положення “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей”, комісією з питань біоетики ОДМУ (протокол № 94 від 19 грудня 2008 р.). Дослідження проведені на 190 білих безпородних щурах-самцях масою 100-200 г. Токсичну нефропатію відтворювали внутрішньо черевинною ін’єкцією водяного розчину дихлориду кадмію дозою 0,1 мг/ 100 г маси 60 щурам та дозою 1 мг/100 г маси - 50 щурам. Вплив кадмію визначали через 2 доби і 7 діб після введення. Контрольну групу складали 80 тварин, яким вводили ізотонічний розчин хлориду натрію в обсязі 0,1 мг/100 г та 1 мг/100 г маси.**

## **Діяльність нирок вивчали в умовах індукованого водного діурезу (металевим зондом вводили внутрішньошлунково відстояну водопровідну воду в об’ємі 5 % від маси тіла) та осмотичного діурезу (металевим зондом вводили внутрішньошлунково 3 % розчин хлорида натрію з осмоляльністю розчину 1050 мосмоль). За 12 год до проведення навантаження тварин обмежували в їжі. Водне та осмотичне навантаження проводили з 800 до 830 вранці натще. Діурез вивчали протягом 2 год при знаходженні в обмінних клітинах.**

## **Тварин виводили із експерименту шляхом декапітації під легкою ефірною анестезією. Отриману кров стабілізували гепарином, центрифугували 15 хв при 3000 об/хв. Плазму відбирали для подальших досліджень.**

### ***Біохімічні* дослідження проводили в отриманих зразках сечі та плазми крові. Величину осмоляльності вимірювали кріоскопичним методом на осмометрі 3D3 (Advanced Instruments, США). Концентрацію креатиніну в сечі та плазмі крові визначали фотометричним методом в реакції з пікриновою кислотою [Рябов С.И. и др., 1979] на спектрофотометрі СФ-46 («Ломо», Росія). Вміст загального кальцію в сечі та плазмі крові аналізували фотометрично на СФ-46 в реакції з арсеназо-III з використанням стандартних діагностичних наборів виробництва фірми Simko Ltd (Україна). Концентрацію фосфатів в сечі та плазмі крові визначали фотометрично на СФ-46 з використанням діагностичних наборів виробництва фірми «Реагент» (Україна). Вміст нітритів та нітратів в плазмі крові та сечі вивчали фотометрично з використанням реактиву Гриса [Емченко Н.Л. и др., 1994] на СФ-46. Концентрацію іонів хлору в сечі та плазмі крові визначали фотометрично з використанням діагностичних наборів виробництва фірми Simko Ltd (Україна) на СФ-46. Вміст білка в сечі вимірювали фотометрично в реакції з сульфосаліциловою кислотою [Михеева А.И., Богодарова И.А., 1969].**

## **Всі показники функціонального стану нирок (екскреторної, осмо- та іонорегулюючих функцій) розраховували відповідно до методів, запропонованих Ю.В. Наточиним (1974), О. Шюк (1981), А.І. Гоженко (1991) на 100 г маси тіла або на 100 мкл клубочкової фільтрації.**

## **Для проведення морфологічних досліджень у щурів видаляли праву нирку і поміщали в 10 % розчин формаліну. Через добу формували тканинний блок шляхом відсічення верхнього та нижнього полюсів нирки. Тканину дофіксовували протягом 24 год в 4 % розчині параформальдегіду. Фіксований матеріал заливали в парафін за загальноприйнятою методикою. З парафінових блоків виготовляли зрізи товщиною 3-5 мкм, частину зрізів зафарбовували гематоксилин-еозином. На інших проводили гістохімічні реакції з альциановим синім на кислі глюкозаміноглікани, трихроматичні реакції за К. Масоном на колагенові волокна, імпрегнацію з метенаміном аргентуму за Д. Джонсом для виявлення стану базальних мембран [Sugulus M., 1976]. Зрізи досліджували під мікроскопом “Leika“ (Чехія).**

## **Статистичний аналіз отриманих даних проводили за допомогою стандартної комп’ютерної програми “Exel”, достовірність міжгрупових відмінностей оцінювали за загальноприйнятим методом з використанням критерію Стьюдента (р < 0,05) [Лакин В.Ю., 2002].**

# Результати досліджень та їх обговорення. **Дослідження функціонального стану нирок щурів через 2 доби після введення дихлориду кадмію дозою 0,1 мг/кг ваги тіла в умовах водного навантаження (табл. 1), не виявили суттєвих змін об’єму діурезу порівняно з контрольними значеннями. Між тим встановлено, що введення дихлориду кадмію супроводжується підвищенням рівня осмоляльності сечі та екскреції осмотично активних речовин, що свідчить про порушення осморегулюючої функції нирок. Показники концентрації креатиніну в сечі щурів піддослідної групи і його екскреції нирками не мають явних відмінностей порівняно з контрольними показниками. В той же час, в групі щурів, яким був введений кадмій, концентрація білку в сечі та його екскреція в 4,5 рази вище за контрольні дані. Через дві доби після введення дихлориду кадмію у вказаній дозі виявлено зниження вмісту в сечі ендогених нітратів до 3,2±0,5 мкмоль/л проти 8,4±1,2 мкмоль/л (p<0,05) в контрольній групі тварин.**

# **При цьому, виведення їх нирками також зменшується з 0,015±0,003 мкмоль/год до 0,005±0,001 мкмоль/год (p<0,05). Встановлено, що під впливом солі кадмію відбувається підвищення концентрації кальцію в сечі (з 0,15±0,04 ммоль/л до 1,25±0,23 ммоль/л, p<0,05) і темпів виведення катіона з сечою (з 0,29±0,05 мкмоль/год до 2,02±0,35 мкмоль/год, p<0,05) на тлі вірогідного зниження концентрації хлора в сечі (до 4,6±0,7 ммоль/л, проти 8,6±1,5 ммоль/л в контролі, p<0,05) та його екскреції з сечею (до 0,007±0,001 мкмоль/год проти 0,016±0,003 мкмоль/год, p<0,05).**

# **Таблиця 1**

#### **Показники діяльності нирок щурів через 2 доби після введення CdCl2 дозою 0,1 мг/кг маси тіла в умовах водного та осмотичного навантажень, (M±m)**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Контрольна | Навантаження | |
| Показники | група  n=10 | водне  n=20 | осмотичне  n=20 |
| Діурез, мл/год | 2,1±0,3 | 1,7±0,3 | 2,2±0,3 |
| Осмоляльність сечі, мосмоль/кгН2О | 105±11 | 238±31\* | 670±14\* |
| Екскреція ОАР, мосмоль/год | 0,21±0,04 | 0,39±0,12\* | 1,55±0,19 |
| Креатинін сечі, мкмоль/л | 1157±144 | 1194±127 | 1216±151 |
| Екскреція креатиніну, мкмоль/год | 2,3±0,2 | 2,0±0,3 | 2,8±0,4 |
| Білок сечі, мг/л | 29±4 | 133±16\* | 240±22\* |
| Екскреція білку, мг/год | 0,05±0,01 | 0,21±0,04\* | 0,53±0,07\* |

*Примітка.* у табл. 1-2 \* – р < 0,05 відносно контрольної групи

Крім того, розрахунки параметрів кліренса креатиніну свідчать, що в умовах водного навантаження через 2 доби після одноразового введення солі кадмію реєструється виразне зменшення даного показника до 253±27 мкл/хв проти 625±46 мкл/хв у інтактних тварин (p<0,05). Тобто вже через дві доби після введення дихлориду кадмію виявляються чіткі ознаки пошкодження нирок, які складаються з двох компонентів – клубочкового та канальцієвого. Про перший свідчить зменшення клуб очкової фільтрації, про другий – порушення осмо- та іонорегулюючих функцій. Ознакою пошкоджень обох відділів нефрону є протеїнурія.

В свою чергу, проведення навантаження 3 % розчином хлориду натрію супроводжується подальшим збільшенням ступеню пошкодження нирок. про що свідчить зростання протеїнурії вдвічі. Поряд з цим виявлені суттєві особливості змін кліренсу креатиніну, який у щурів з токсичною кадмієвою нефропатією не відрізнявся від показників у контрольних тварин після водного навантаження і складав 545±31 мкл/хв., хоча осмотичне навантаження призводило до значного його збільшення – до 998±54 мкл/хв (p<0,05). Навантаження сольовим розчином тварин через 2 доби після введення дихлорида кадмію в дозі 0,1 мг/кг маси тіла призводить до зменшення величини осмоляльності сечі на тлі незначного коливання діурезу. Порівняно з водним навантаженням навантаження 3 % розчином хлориду натрію супроводжується різким посиленням протеїнурії.

В ході дослідження функції нирок через 7 діб після введення дихлорида кадмію в дозі 0,1 мг/кг маси в умовах водного навантаження у щурів тіла не знайдено вірогідних змін величини діурезу, тоді як і осмоляльність сечі в групі експериментальних тварин вище в 2 рази, так і екскреція осмотично активних речовин (рис. 1). Показники концентрації та екскреції креатиніну вірогідно перевищують контрольні значення.

Рис. 1. Порівняльна характеристика показників діяльності нирок щурів через 7 діб після введення CdCl2  дозою 0,1 мг/кг маси тіла при водному та осмотичному навантаженні.

\* - р < 0,05 відносно контрольної групи

\*\* - р < 0,05 відносно водного навантаження

Не знайдено суттєвих міжгрупових відмінностей між показниками концентрації ендогених нітратів в сечі (10,5±1,5 і 8,8±1,6 мкмоль/л в контрольній та піддослідній групах відповідно) і їх екскреції (0,019±0,003 мкмоль/год у інтактних тварин проти 0,017±0,003 мкмоль/год через 7 діб після введення соля кадмія). В той же час, екскреція білка зберігається на більш високому рівні. Величини концентрації хлору в сечі експериментальних тварин (8±2 ммоль/л) і його екскреції (0,016±0,003 мкмоль/год) не відрізняються від аналогічних параметрів контрольної групи тварин (відповідно 5±2 ммоль/л та 0,011±0,002 мкмоль/год). Разом з тим, концентрація фосфатів в сечі щурів піддослідної групи (9,8±0,7 ммоль/л) перевищує контрольні показники (6,5±0,8 ммоль/л, p<0,05). При цьому екскреція з сечою неорганічних фосфатів також вірогідно підвищується (до 19,6±3,1 мкмоль/год проти 12,4±1,6 мкмоль/год в контролі). Слід зазначити, що через 7 діб після введення дихлорида кадмію в дозі 0,1 мг/1 кг маси тіла відмічається відновлення кліренсу, як при водному (487±28 мкл/хв), так і при водно-сольовому (857±52 мкл/хв) навантаженнях. В той же час в групі інтактних щурів аналогічні параметри складали 512±32 та 900±47 мкл/хв відповідно.

# **Аналіз реакції нирок тварин на сольове навантаження через 7 діб після введення дихлорида кадмію в дозі 0,1 мг/кг маси тіла показав вірогідне зменшення діурезу порівняно з контрольною групою тварин, а також чітке підвищення осмоляльності сечі і концентрації креатиніну в сечі. Поряд з цим, величини концентрації білка в сечі та його виведення нирками тварин піддослідної групи залишаються на більш високому рівні як відносно контролю, так і при співставленні з даними водного навантаження. Темпи виведення нирками ендогенних ніритів та нітратів дещо зменшуються порівняно з інтактними щурами (0,0027±0,0004 проти 0,0060±0,0008 мкмоль/год і 0,046±0,003 проти 0,065±0,005 мкмоль/год відповідно, p<0,01).**

В табл. 2 представлені показники функціонального стану нирок щурів через 2 доби після введення дихлорида кадмію в дозі 1 мг/кг маси тіла на тлі водного навантаження.

Таблиця 2

#### **Показники діяльності нирок щурів через 2 доби після введення CdCl2 дозою 1,0 мг/кг маси тіла в умовах водного та осмотичного навантажень, (M±m)**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Контрольна | Навантаження | |
| Показники | група  n=10 | водне  n=20 | осмотичне  n=20 |
| Діурез, мл/год | 1,7±0,2 | 1,7±0,4 | 2,0±0,2 |
| Осмоляльність сечі, мосмоль/кгН2О | 127,3±13,1 | 123,2±14,4 | 613,4±11,2\* |
| Екскреція ОАР, мосмоль/год | 0,19±0,04 | 0,20±0,05 | 1,1±0,10\* |
| Креатинін сечі, мкмоль/л | 1803,2±144,3 | 811,5±105,7\* | 1068,2±135,6\* |
| Екскреція креатині ну, мкмоль/год | 3,01±0,29 | 1,36±0,32\* | 2,08±0,22\* |
| Білок сечі, мг/л | 15,3±4,1 | 33,4±6,3\* | 65,2±6,4\* |
| Екскреція білку, мг/год | 0,025±0,04 | 0, 055±0,11\* | 0,043±0,02\* |

Встановлено, що вплив більшої дози солі кадмію не призводить до помітних змін діурезу. Також не знайдено суттєвих міжгрупових відмінностей осмоляльності сечі і виведення нирками осмотично активних речовин. В той же час, виявлено, що введення в даній дозі солі кадмію викликає зменшення концентрації креатиніну в сечі та його ниркової екскреції на тлі посилення ознак протеїнурії, хоча, не виявлено відчутливих міжгрупових відміностей значення екскреції неорганічних фосфатів на тлі незначного приросту екскреції кальцію. Важливо вказати, що на відміну від попередніх серій експерименту, в даній групі тварин спостерігається зниження параметрів ниркової екскреції не тільки ендогених нітратів (з 0,014±0,002 мкмоль/год в контролі, до 0,007±0,003 мкмоль/год в експериментальній групі, p<0,05), але і нітритів (з 0,0032±0,0004 мкмоль/год до 0,0017±0,0003 мкмоль/год відповідно, p<0,05). Визначено також, що через дві доби після введення щурам дихлорида кадмію в дозі 1 мг/кг маси тіла реєструється чітке зниження рівня кліренса креатиніну як при водному навантаженні (398±43 мкл/хв), так і при внутрішньошлунковому введенні сольового розчину (469±11 мкл/хв). При цьому, в контрольній групі аналогічні показники складали 708±82 и 1073±28 мкл/хв відповідно. Крім того, динаміка швидкості клубочкової фільтрації в піддослідній групі та в інтактних тварин демонструють не тільки падіння кліренса креатиніну під впливом солі кадмію, але і нездатність нирок, на які впливали ксенобіотики, до реалізації ниркового функціонального резерву.

В свою чергу, аналіз діяльності нирок в умовах навантаження тварин сольовим розчином через 2 доби після введення CdCl2 в дозі 1 мг/кг маси тіла вказує на зниження осмоляльності сечі та екскреції осмотично активних речовин. Встановлено, що концентрація креатиніна в сечі та його екскреція знижується під впливом солі кадмію. Між тим ознаки протеїнурії носять помірний характер на тлі значного зменшення виведення нирками ендогенних нітритів (до 0,0037±0,0006 мкмоль/год проти 0,0099±0,0016 мкмоль/год в контрольній групі, p<0,05) і нітратів (до 0,018±0,003 мкмоль/год проти 0,072±0,012 в контролі, p<0,01).

В ході дослідження особливостей функціонального стану нирок щурів через 7 діб після введення дихлорида кадмію в дозі 1 мг/кг маси тіла (рис. 2) не знайдено суттєвих змін величини діурезу в експериментальній групі тварин порівняно з контролем. В той же час, показано, що на тлі надходження до організму дихлорида кадмію відбувається майже дворазове збільшення рівня осмоляльності та темпів виведення нирками осмотично активних речовин. Разом з тим, встановлено чітке зниження концентрації креатиніну в сечі та його екскреції. Слід відмітити, що підвищення вмісту білка в сечі і вірогідно високі рівні його екскреції вказують на те, що на даному етапі перебігу ниркової недостатності, індукованої іонами кадмію, зберігаються виражені ознаки протеїнурії.

Також зберігаються й більш високі величини екскреції неорганічних фосфатів (10,9±0,4 мкмоль/год проти 7,1±0,3 мкмоль/год в контролі, p<0,01). Однак, темпи виведення нирками фізіологічно активного метаболіту молекули оксиду азоту – ендогенних нітритів, суттєво не відрізняються від аналогічного параметру в контрольній групі. При цьому, значення екскреції нирками кінцевого метаболіту NO – нітратів суттєво нижче, ніж у інтактних щурів (0,006±0,001 і 0,010±0,002 мкмоль/год відповідно). Поряд з цим кліренс креатиніну в експериментальній групі щурів в умовах водного (258±28 мкл/хв) і водно-сольового (397±16 мкл/хв) навантажень значно нижче, ніж у інтактних тварин (504±57 и 973±22 мкл/хв відповідно).

Рис. 2. Порівняльна характеристика показників діяльності нирок щурів через 7 діб після введення CdCl2 дозою 1,0 мг/кг маси тіла при водному та осмотичному навантаженні.

\* - р < 0,05 відносно контрольної групи

\*\* - р < 0,05 відносно водного навантаження

Між тим, в умовах навантаження 3 % розчином хлорида натрію у тварин через 7 діб після введення CdCl2 в дозі 1 мг/кг маси тіла реєструється зниження діурезу, екскреції осмотично активних речовин, концентрації креатиніну в сечі та екскреції креатиніну, а також підвищення концентрації білка в сечі. При цьому темпи виведення нирками білка змінюються незначно, а показники екскреції кальцію і фосфатів зменшуються. Не знайдено статистично значних змін параметрів екскреції ендогених нітритів, в той час як величина екскреції нітратів зберігається на більш низькому рівні в порівнянні з інтактними тваринами (0,033±0,006 і 0,068±0,009 мкмоль/год відповідно, p<0,05). У цілому при збільшенні дози кадмію ступінь порушень нирок зростає.

Результати гістологічних досліджень показали, що інтоксикація нирок іонами кадмію як дозою 0,1 мг/кг маси тіла так і 1,0 мг/кг призводить до змін в капілярах клубочків та епітелії проксимальних і дистальних канальців, які проявляються в набуханні ендотеліоцитів та діапедезному проникненні еритроцитів до просвіту канальця (рис. 3). Реєструється також потовщення стінок мальпігієвих телець. Патоморфологічні дослідження стану канальцієвого відділу нефрону показали, що найбільш вагомі зміни відбуваються в проксимальному сегменту нефрону, тим самим підтверджують нашу думку, що саме ураження проксимального відділу нефрону є одним з основних патогенетичних механізмів, який веде до розвитку ознак гострої ниркової недостатності та хронізації патологічного процесу.

Рис. 3. Нирка щура через 2 доби після введення CdCl2 дозою 1,0 мг/кг маси тіла. Водне навантаження. Розширення капсули клубочка, набряк та руйнування епітелію проксимальних звитих канальців. Забарвлення гематоксилін-еозин. Ок. 10, об. 40

Таким чином, проведені дослідження показали, що введення дихлорида кадмію щурам дозою 0,1 мг/кг маси тіла через 2 доби після введення викликає нефротоксичний ефект, який проявляється як на рівні фільтрації, так й канальцевого транспорту, що супроводжується порушенням екскреторної, іонорегулюючої та осморегулюючої функції нирок. Також встановлено, що залежно від стану осмотичного гомеостазу (в умовах водного і осмотичного навантаження) функція нирок у контрольних і піддослідних щурів змінюється. Порівняно з водним навантаженням, при гострому сольовому навантаженні відмічається дворазове збільшення кліренсу креатиніну. Така закономірність може інтерпретуватися, як реалізація ниркового функціонального резерву, внаслідок якого зростає навантаження нефронів і є ознакою гіперфільтрації. У кінцевому рахунку у здорових щурів зростають функціональні можливості нирок щодо видалення кінцевих продуктів обміну та здатності регулювати осмотичний й іонний гомеостаз.

Ефект підвищення кліренсу креатиніну при використанні осмотичного навантаження зберігається на тлі введення хлорида кадмію. Однак, абсолютні значення приросту суттєво менші, що може бути обумовлено скороченням популяції чи пошкодженням діючих нефронів. З одного боку це зменшує регуляторні гомеостатичні можливості нирок, але одночасно завдяки цьому ступінь ниркових витрат зменшується, бо збільшення завантаження нефронів, тобто гіперфільтрація, при пошкодженні канальцієвого їх відділу може призвести до такого зростання виведення з сечою іонів, що викликає незворотні порушення гомеостазу. Про це свідчить збільшення протеїнурії, яка спостерігається в цих умовах. Тобто, зменшення фільтрації внаслідок кадмієвого пошкодження нефронів є порушенням функції, але зниження функціонального ниркового резерву при цьому слід розглядати як пристосувальну реакцію.

Аналіз функції нирок щурів, які підлягали впливу дихлориду кадмію в дозі 1 мг/кг маси тіла, дає підстави стверджувати, що нефротоксичний ефект іонів кадмію здебільшого обумовлений ушкодженням судинно-клубочкового апарату нирок, що проявляється у зменшенні кліренсу креатиніну і відсутності приросту клубочкової фільтрації у відповідь на навантаження сольовим розчином, тобто в блокуванні механізмів ниркового функціонального резерву. Слід зазначити, що таке дозозалежне зниження величини кліренса креатиніну і ниркового функціонального резерву поєднується зі зменшенням ниркового кліренса основного хімічно стабільного метаболіту молекули оксиду азоту – ендогених нітратів. Це підтверджує дані щодо важливої ролі системи ендогенного оксиду азоту у реалізації функціонального ниркового резерву. Зменшення продукції ендогенних окислів азоту можна розглядати як наслідок пошкодження ендотелію капілярів клубочків. Пригнічення утворення оксиду азоту у свою чергу зменшує нирковий кровообіг, фільтраційний тиск, а, зрештою, і швидкість клуб очкової фільтрації.

Порушення канальцієвого відділу нефрону носять менш виражений характер, особливо в дистальних сегментах і збирательних трубочках, про що свідчить здатність канальцевого відділу нефрона майже адекватно реагувати на гіпер- та гіпоосмотичні види навантажень.

# ВИСНОВКИ

В дисертації наведене теоретичне обґрунтування і нове вирішення наукової проблеми, що виявляється у дослідженні патогенетичних механізмів порушень функціонального стану нирок при токсичній кадмієвій нефропатії. Проведено експериментальне вивчення дозозалежних механізмів патогенезу змін осморегулюючої функції нирок і ниркового функціонального резерву в умовах гострого та підгострого періодів кадмієвої нефропатії.

1. Встановлено, що через 2 доби після введення дихлорида кадмію щурам в дозі 0,1 мг/кг маси тіла реєструються чіткі ознаки порушень діяльності нирок, які проявляються в зменшенні швидкості клубочкової фільтрації в 2 рази, скороченні ниркового функціонального резерву, підвищенні екскреції білка майже в 3,5 рази, осмотично активних речовин і кальція.

2. Показано, що через 7 діб після введення дихлорида кадмію відбувається відновлення величини швидкості клубочкової фільтрації і ниркового функціонального резерву на тлі зниження ниркових втрат білка, осмотично активних речовин і кальцію.

3. Вплив дихлориду кадмію у дозі 1 мг/кг маси тіла на процеси фільтрації у нирці проявляється у стійкому зменшенні величини кліренса креатиніну і відсутності ниркового функціонального резерву протягом всього періоду спостережень.

4. Виявлено, що ознаки пошкодження канальцевого відділу нефрона при введенні солі кадмію у дозі 1 мг/кг маси тіла найбільш виражені через 7 діб після введення ксенобіотика.

5. При токсичній кадмієвій нефропатії дозозалежно порушуються осморегулююча та іонорегулююча функції внаслідок пошкодження судинно-клубочкового та канальцевого відділів нефрону.

6. Встановлено, що введення солі кадмію супроводжується дозозалежним зменшенням ниркового кліренсу основного хімічно стабільного метаболіта молекули оксида азоту – ендогених нітратів.

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Карчаускас В. Ю. Особенности экзогенного угнетения и стимуляции NО-продукции у фагоцитирующих нейтрофилов / А. И. Гоженко, И. В. Николаевская, И. В.Савицкий, В. Ю. Карчаускас // Медицина сегодня и завтра. - 2001. - № 1.-С. 24-28*. Внесок дисертанта: аналіз джерел літератури, відтворення експериментальних моделей, оформлення роботи.*
2. Карчаускас В. Ю. Состояние канальциевого транспорта натрия белых крыс, подвергшихся воздействию радиоактивного йода / С. И. Доломатов, А. И. Гоженко, В. Ю. Карчаускас, О. В. Клыков, B. C. Калистратова, Г.Н. Мигур // Нефрология. - 2002. - Т. 6, № 1.- С. 82-86. *Внесок дисертанта: проведення експериментів, статистична обробка та аналіз результатів.*
3. Карчаускас В. Ю. Функция почек при кадмиевой нефропатии в условиях водной и солевой нагрузок / А. И. Гоженко, С. И. Доломатов, Е. А. Доломатова, В. Ю. Карчаускас, Д. М. Пыхтев // Нефрология. - 2002.- Т. 6, № 3. - С. 75-78. *Внесок дисертанта: постановка та проведення експерименту, статистичний аналіз даних, оформлення роботи.*
4. Карчаускас В. Ю. Вплив хлориду кадмію на стан осморегулювальної функції нирок білих щурів за умов водного та водно-сольового навантаження / В. Ю. Карчаускас, А. І. Гоженко, С. І. Доломатов // Одеський медичний журнал. - 2002. - № 6. - С. 16-19. *Внесок дисертанта: проведення експериментів, аналіз результатів, написання висновків.*
5. Карчаускас В. Ю. Значение возрастных особенностей в реакции почек крыс на однократное введение дихлорида кадмия / А. И. Гоженко, С. И. Доломатов, Л. В. Романив, В. Ю. Карчаускас, Е. А. Доломатова // Буковинський медичний вісник. - 2003. - № 1-2. - С. 27-31. *Внесок дисертанта: аналіз результатів, участь у написанні статті.*
6. Карчаускас В. Ю. Функция почек крыс в условиях водной и солевой нагрузки при воздействии дихлора кадмия / А. И. Гоженко, С. И. Доломатов, В. Ю. Карчаускас, Е. А. Доломатова, Д. М. Пыхтеев // Медицина труда и промышленная экология. - 2004. - № 8. - С. 45-48. *Внесок дисертанта: проведення дослідження, аналіз даних, участь у написанні статті.*
7. Карчаускас В. Ю. О нефротоксических эффектах различных доз хлорида кадмия / В.Ю. Карчаускас, С. Г. Котюжинская // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2006. – № 2. – С. 47-48 (Патогенетичні механізми токсичних нефропатій : симп., 25-27 трав. 2006 р. : тези допов.). *Внесок дисертанта: проведення експерименту, статистична обробка, аналіз результатів, написання та оформлення тез.*
8. Карчаускас В. Ю. Функциональный почечный резерв и патология почек / А. Н. Слученко, А. К. Лобанов, В. Ю. Карчаускас, И. Ю. Бадьин, В. А. Жуков // Труды Крымского гос. мед. ун-та им. С.И. Георгиевского. – 2006. – Т. 142, Ч. ІІІ. – С. 249-250 (Фундаментальні аспекти сучасної медицини : пленум патофізіологів України з між народ. участю, 5-6 жовтня 2006 р. : тези допов.). *Внесок дисертанта: проведення дослідження, статистична обробка даних.*
9. Карчаускас В. Ю. Особенности почечной экскреции осмотически активных веществ у крыс разного возраста / Л. В. Романив, В. Ю. Карчаускас // V читання ім. В.В. Підвисоцького : наук. конф., 25-26 трав. 2006 р. : тези допов. – Одеса, 2006. – С. 47-48. *Внесок дисертанта: участь у формуванні загальної концепції, проведення експерименту, статистична обробка, написання та оформлення тез.*
10. Карчаускас В. Ю. Неспецифические и специфические факторы нефротоксического действия хлорида кадмия / В. Ю. Карчаускас, С. Г. Котюжинская, В. Р. Василишина // VІ читання ім. В.В. Підвисоцького : наук. конф., 31 травн. – 1 черв. 2007 р. : тези допов. – Одеса, 2007. – С. 71-72. *Внесок дисертанта: проведення експериментів, аналіз та узагальнення результатів, написання та оформлення тез.*
11. Карчаускас В. Ю. Обмен неорганических окислов азота при кадмиевой нефропатии / В. Ю. Карчаускас, В. А. Жуков // Гомеостаз: фізіологія, патологія, фармакологія і клініка : ІІІ Міжн. наук. конф., 6-7 верес. 2007 р. : тези допов. – Одеса, 2007. – С. 11-12. *Внесок дисертанта: проведення експерименту, аналіз та узагальнення результатів, написання та оформлення тез.*

**АНОТАЦІЯ**

***Карчаускас В.Ю.* Патофізіологія нирок і осмотичного гомеостазу за умов кадмієвої нефропатії.** – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія. – Одеський державний медичний університет МОЗ України, Одеса, 2009.

Дисертація присвячена вивченню патогенетичних механізмів порушень функції нирок білих щурів в умовах одноразового надходження до організму тварин дихлорида кадмію в дозі 0,1 мг та 1 мг/кг маси тіла через 2 та 7 діб після введення солі кадмію в умовах індукованого діурезу (водного навантаження в об’ємі 5 % від маси тіла і осмотичного навантаження 3 % розчином хлориду натрію в об’ємі 5 % від маси тіла внутрішньошлунково). Встановлено, що через 2 доби після введення солі кадмію в дозі 0,1 мг/кг маси тіла на тлі виражених ознак пошкодження канальцевого відділу нефрона (протеінурія та підвищення ниркових втрат осмотично активних речовин) має місце зниження величини швидкості клубочкової фільтрації та зменшення екскреції ендогених нітратів. При цьому, осмотичне навантаження сприяло посиленню протеінурії як через 2 доби, так і через 7 діб. Показано, що через 7 діб після введення ксенобіотика, в умовах водного навантаження реєструвалося зниження протеінурії і відновлення швидкості клубочкової фільтрації та екскреції ендогених нітратів. Аналіз реакції нирок щурів на водне та осмотичне навантаження через 7 діб після введення дихлорида кадмію в дозі 1 мг/кг маси тіла свідчить про негативну динаміку перебігу кадмій-індукованної ниркової недостатності в даній групі тварин: зниження рівня вихідного рівня та стимульованих значень швидкості клубочкової фільтрації і протеінурією. Зроблено висновок, що нефротоксичний ефект іонів кадмію здебільшого обумовлений ушкодженням судинно-клубочкового апарату нирок, який проявляється в зменшенні кліренса креатиніну і відсутності приросту клубочкової фільтрації у відповідь на навантаженням сольовим розчином, тобто в блокуванні механізмів ниркового функціонального резерву одночасно з порушенням функції канальців.

***Ключові слова*:** щури, дихлорид кадмію, токсична нефропатія, нирковий функціональний резерв.

**АННОТАЦИЯ**

***Карчаускас В.Ю.* Патофизиология почек и осмотического гомеостаза в условиях кадмиевой нефропатии.** – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.04 - патологическая физиология. - Одесский государственный медицинский университет МЗ Украины, Одесса, 2009.

Диссертация посвящена изучению патогенетических механизмов нарушения функции почек белых крыс в условиях однократного поступления в организм животных дихлорида кадмия в дозе 0,1 или 1 мг/кг массы тела через 2 и через 7 суток после введения соли кадмия. Водный раствор дихлорида кадмия вводили животным внутрибрюшинно. Исследования деятельности почек проведены в условиях индуцированного диуреза с использованием водной нагрузки и осмотической нагрузки 3 % раствором хлорида натрия. Объем вводимой внутрижелудочно жидкости составлял 5 % от массы тела. Прямое сопоставление параметров деятельности почек крыс экспериментальных групп в условиях водной нагрузки и нагрузки солевым раствором использовалось для определения состояния почечного функционального резерва и выявления скрытых повреждений канальцевого отдела нефрона. Исследования выполнены на 190 белых крысах-самцах с массой тела 100-200 г.

Установлено, что через 2 суток после введения соли кадмия в дозе 0,1 мг/ кг массы тела на фоне выраженных признаков повреждения канальцевого отдела нефрона (протеинурия и повышение почечных потерь осмотически активных веществ) имеет место снижение величины скорости клубочковой фильтрации и уменьшение экскреции эндогенных нитратов. При этом, нагрузка 3% раствором хлорида натрия способствовала усилению протеинурии. Однако стимулированный солевым раствором прирост скорости клубочковой фильтрации был значительно ниже, чем в контроле, так же, как и темпы выделения почками эндогенных нитратов. Через 7 суток после введения крысам указанной дозы дихлорида кадмия в условиях водной нагрузки регистрируется снижение протеинурии и восстановление скорости клубочковой фильтрации и экскреции эндогенных нитратов. В то же время, использование нагрузки солевым раствором показало, что наряду с нормализацией стимулированных показателей скорости клубочковой фильтрации имеет место усиление величин экскреции почками белка.

По данным водной и водно-солевой нагрузок, проведенным через 2 суток после введения крысам дихлорида кадмия в количестве 1 мг/кг массы тела установлено отчетливое понижение скорости клубочковой фильтрации и почечного функционального резерва на фоне сниженных значений экскреции эндогенных нитратов. При этом выраженные признаки протеинурии регистрировались только в ходе использования нагрузки солевым раствором. Анализ реакции почек крыс на водную и водно-солевую нагрузки через 7 суток после введения дихлорида кадмия в дозе 1 мг/кг массы тела свидетельствует о негативной динамике течения кадмий-индуцированной почечной недостаточности в данной группе животных. Такое заключение подтверждается пониженными уровнями исходных и стимулированных значений скорости клубочковой фильтрации и протеинурией.

Результаты проведенных функциональных проб и патоморфологических исследований указывают, что наряду с прямым токсическим воздействием ионов кадмия на канальцевый отдел нефрона, имеет место повреждение его сосудисто-клубочкового аппарата, о чем свидетельствует уменьшение скорости клубочковой фильтрации, почечного функционального резерва и ренального клиренса эндогенных нитратов. В то же время, положительная динамика значений гомеостатических функций органа через 7 суток после введения 0,1 мг дихлорида кадмия на 1 кг массы тела сопровождается нормализацией уровня скорости клубочковой фильтрации, почечного функционального резерва и почечного клиренса эндогенных нитратов.

***Ключевые слова*:** крысы, дихлорид кадмия, токсическая нефропатия, почечный функциональный резерв.

###### SUMMARY

Karchauskas V.Yu. Pathophysiology of kidneys and osmotic homeostasis in the cadmiums of nephropathy. – Manuscript.

Thesis for a scientific degree of kandidat of medical sciences in speciality 14.03.04 – pathological physiology. – Odesa State Medical University Ministry of Health Care of Ukraine, Odesa, 2009.

Dissertation is devoted to the study of pathogenetic mechanisms of renal function’s disturbanees of white rats in the conditions of one time injection of cadmium dichloride into animal’s organism in dose 0,1 mg and 1 mg/kg of the mass of the body in 2 and 7 days after introduction of salts of cadmium in the conditions of induced diuresis (water loading in the volume of 5 % from the mass of the body and osmotic loading by 3 % solution of chloride of sodium in the volum of 5 % from the mass of the body which were introducad into the stomach).

It has been established, that there is the decrease of renal filtration’s speed and excreation of endogenic nitrates after injection of salts of cadmium in dose of 0,1 mg/kg of the mass og the body on the background of expressed signs of nephron’s injured tubular part (proteinuria and the increase of renal losses of osmotic active substances).

In this case, osmotic loading stimutated the increase of proteinuria, as in 2 days, as in 7 days. It was shown, that there were registrated the decrease of proteinuria and restoration of renal filtration’s speed and excretion of the endogenous nitrates in 7 days after injection in the conditions of water loading. Analysis of the renal reaction of rats on water and osmotic loading shows negative dynamics of cadmium induced renal deficiency in this animal’s group in 7 days after injection cadmium dichloride in dose 1 mg/kg of the mass of the body: the increase of level and stimulated indexes of renal filtration’s speed with proteinuria. The conclusion is made that renal-toxical effect of cadmium’s ions is conditional by injure of the glomerular apparatus of the kidneys. This effect is expressed by reduction of creatinin’s clirens and absence of the increase of renal filtration in the conditions of osmotic loading, as result of blockade of mechanisms of renal functional reserve.

***Key words:*** rats, cadmium dichloride, toxic nephropathy, renal functional reserve.

Підписано до друку 06.05.09 р. формат 60х90/16

Ум.друк.арк. 0,9. Обл.-вид. арк. 0,9.

Тираж 100. Зам. 47

«Рекламно-производственное предприятие «ЭкспрессРеклама”

м. Одеса, вул. Пастера, 26

тел.: 723-69-74 e-mail: expressreklamal@rambler.ru

 Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>