

Соколова М.О.^{1,2}, Соболев В.Е.¹, Гончаров Н.В.¹

Гистологические и ультраструктурные изменения в почках крыс на ранних сроках после отравления параоксоном

¹ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова» Российской академии наук, 194223, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация;

²ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, 194044, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

Введение. Токсические нефропатии не ограничиваются единственным морфологическим типом повреждения тканей почек. Широкое распространение фосфорорганических соединений (ФОС) в современном мире делает необходимым изучение морфологических проявлений и отставленных последствий влияния ФОС на разные органы и ткани организма человека и животных.

Материал и методы. В статье представлены результаты исследования гистологических изменений в почках крыс в ранние сроки после однократного парентерального введения параоксона в дозах ЛД₅₀ и ЛД₈₄.

Результаты. Показано, что после введения параоксона первоначально повреждаются эпителиальные клетки извитых канальцев, а через 1 неделю после отравления изменения регистрируются в почечном тельце, проявляясь в увеличении толщины гломерулярной базальной мембраны.

Ограничение исследований. Морфологические изменения в тканях почек анализировались при однократном отравлении в дозах ЛД₅₀ и ЛД₈₄.

Заключение. Выявленные в почечном тельце изменения свидетельствуют о целесообразности дальнейшего исследования влияния ФОС на характер, последовательность и механизм нефротоксического эффекта ФОС в моделях острой и хронической интоксикации.

Ключевые слова: фосфорорганические соединения; параоксон; почки; гломерулярная базальная мембрана; эпителий извитых канальцев

Соблюдение этических стандартов. Экспериментальное исследование одобрено локальным этическим комитетом ГБУН ИЭФБ имени И.М. Сеченова РАН.

Для цитирования: Соколова М.О., Соболев В.Е., Гончаров Н.В. Гистологические и ультраструктурные изменения в почках крыс на ранних сроках после отравления параоксоном. *Токсикологический вестник*. 2022; 30(4): 231-237. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2022-30-4-231-237>

Для корреспонденции: Соколова Маргарита Олеговна, младший научный сотрудник научно-исследовательского центра ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ, 194044, г. Санкт-Петербург. E-mail: sokolova.rita@gmail.com

Участие авторов: Соколова М.О. – сбор и обработка материала, статистический анализ, написание текста; Соболев В.Е. – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, редактирование; Гончаров Н.В. – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, редактирование. Все соавторы – одобрение окончательной версии статьи, ответственность за целостность всех её частей.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке госпрограммы АААА-А18-118012290142-9.

Поступила в редакцию: 13.09.2021 / Принята в печать: 21.07.2022 / Опубликовано: 30.08.2022

Sokolova M.O.^{1,2}, Sobolev V.E.¹, Goncharov N.V.¹

Histological and ultrastructural changes in rat kidneys in the early period after paraoxone poisoning

¹I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, 194223, Russian Federation;

²The named after S.M. Kirov Military Medical Academy of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Saint-Petersburg, 194044, Russian Federation

Introduction. Toxic nephropathies are not limited to a single morphological type of kidney tissue damage. The widespread distribution of organophosphorus compounds (OPs) in the modern world makes it necessary to study the morphological manifestations and delayed effects of OPs on various organs and tissues of the human and animal body.

Material and methods. The article presents the results of a study of changes in the kidneys of rats at the ultrastructural level in the early stages after a single injection of paraoxon at doses of LD₅₀ and LD₈₄.

Results. It has been shown that after the introduction of paraoxon, the epithelial cells of the convoluted tubules are initially damaged, and a week after the poisoning, changes are recorded in the renal corpuscle, manifested in an increase in the thickness of the glomerular basement membrane.

Limitations. Morphological changes in the renal tissues were analyzed in a single poisoning at doses of LD₅₀ and LD₈₄.

Conclusion. The changes detected in the renal corpuscles indicate the feasibility of further studies on the effect of FOS on the nature, sequence and mechanism of nephrotoxic effects of FOS in models of acute and chronic intoxication.

Keywords: organophosphates; paraoxon; kidneys; glomerular basement membrane; epithelium of convoluted tubules

Compliance with ethical standards. The experimental study was approved by the local ethical committee of the I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences.

For citation: Sokolova M.O., Sobolev V.E., Goncharov N.V. Histological and ultrastructural changes in rat kidneys in the early period after paraoxone poisoning. *Toksikologicheskii vestnik (Toxicological Review)*. 2022; 30(4): 231-237. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2022-30-4-231-237> (In Russian)

For correspondence: Margarita O. Sokolova, Junior Researcher of the Research Center of the named after S.M. Kirov Military Medical Academy of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Saint-Petersburg, 194044, Russian Federation. E-mail: sokolova.rita@gmail.com

Information about the authors:

Sobolev V.E., <https://orcid.org/0000-0001-7775-8205>

Scopus Author ID 57193455746

Goncharov N.V., <https://orcid.org/0000-0002-5452-2125>

Scopus Author ID 11839893100

Contribution of the authors: Sokolova M.O. – collecting and processing of the material, statistical analysis, writing a text. Sobolev V.E. – the concept and design of the study, collecting and processing of the material, editing. Goncharov N.V. – the concept and design of the study, collecting and processing of the material, editing. All co-authors – approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Acknowledgments. The work was carried out with the support of the state program AAAA-A18-118012290142-9.

Received: September 13, 2021 / Accepted: July 21, 2022 / Published: August 30, 2022

Введение

Ткань почек является крайне уязвимой для воздействия токсичных химических веществ — метаболическая активность ее структурных компонентов, а также способность концентрировать химические вещества обеспечивают вторичную реабсорбцию и циклическое воздействие токсиканта на организм [1, 2]. Широкое распространение фосфорорганических соединений (ФОС) создает риск развития почечной патологии у лиц, находящихся в непосредственном контакте с ними. Повреждение проявляется разнообразно и может выражаться как значительной степенью гломерулосклероза, так и диффузным тубулоинтерстициальным повреждением [2]. Параоксон и его аналоги являются естественными метаболитами некоторых ФОС, что позволяет применять его для модели отравления. В настоящее время считается, что основными патогенетическими механизмами, вызывающими повреждение тканей почек при воздействии ФОС, являются нарушения гемодинамики — длительная ишемия и реперфузионная травма, вызывающие острый канальцевый некроз [3, 4]. В этом ключе роль оксидативного стресса и функционального состояния митохондрий становится решающей в индукции гибели почечных клеток [4]. Однако эпителий извитых канальцев является не единственным структурным звеном, страдающим при отравлении ФОС. Фильтрационный барьер почек (ФБП) — это узкоспециализированное структурное образование организма, обеспечивающее фильтрацию низкомолекулярных компонентов плазмы крови при формировании первичной мочи, при этом ограничивающее фильтрацию макромолекул [5]. Целостность барьера поддерживается за счет физико-химического взаимодействия между тремя его составляющими — эндотелиальными клетками, гломерулярными базальными мембранами (ГБМ) и подоцитами [6]. Нарушение структурной организации ФБП, например при диабетической нефропатии, постепенно развивается в течение нескольких лет до того, как станут очевидными клинические проявления [5]. Понимание патологических механизмов, вызывающих нарушение этого взаимодействия, является важным аспектом для выяснения факторов патогенеза многих наследственных и приобретенных заболеваний, а также токсического повреждения, в результате которого существует риск развития гломерулосклероза [5, 7].

Цель исследования — оценить динамику развития повреждения ткани почек животных на ран-

них сроках после острого отравления параоксоном. В ходе работы анализировались гистологические и ультрамикроскопические изменения в почках отравленных животных при воздействии различных доз отравляющего вещества.

Материал и методы

Исследования проведены на крысах-самцах Wistar массой тела 200–250 г. В рамках данного этапа исследований использовали 25 животных, из которых методом модифицированной блочной рандомизации были сформированы 3 группы: интактный контроль ($n = 7$), ЛД₅₀ ($n = 9$) и ЛД₈₄ ($n = 9$). Содержание и использование животных соответствовало рекомендациям межгосударственного стандарта ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными».

Параоксон крысам опытных групп вводили однократно, путем подкожной инъекции в дозе 240 мкг/кг (ЛД₅₀) и 250 мкг/кг (ЛД₈₄) в 0,9% растворе натрия хлорида. Указанные дозы параоксона были предварительно определены как соответствующие ЛД₅₀ и ЛД₈₄ с учетом биодegradации препарата. Интактным животным контрольной группы вводили аналогичный объем 0,9% раствора натрия хлорида. В соответствии с дизайном эксперимента через 24 ч, 3 и 7 сут крыс умерщвляли методом декапитации с использованием гильотины и отбирали образцы ткани почек для исследования.

Материал для гистологического и ультрамикроскопического исследования фиксировали в 10% забуференном формалине и 2,5% глutarовом альдегиде, обрабатывали по стандартной методике, окрашивали гематоксилином и эозином; двойное контрастирование ультратонких срезов осуществляли раствором нитрата свинца и 1% водным раствором уранилацетата. Исследование проводили на световом микроскопе Axio ImagerA2 (Carl Zeiss) и электронном микроскопе Merlin (Carl Zeiss). Анализ полученных изображений и морфометрию выполняли в программе Axio Vision 4.8.2 (Carl Zeiss).

На полученных гистологических препаратах измеряли радиус почечного тельца, радиус расположения петель в клубочке, диаметр извитых канальцев, диаметр просвета извитых канальцев. Все измерения проводились на 10 полях зрения с увеличением $\times 200$. Для выявления изменений на ультраструктурном уровне анализировали неперекрывающиеся участки ткани, в среднем 4 клубочка с прилегающими канальцами для каждого животного. В полученных препаратах изме-

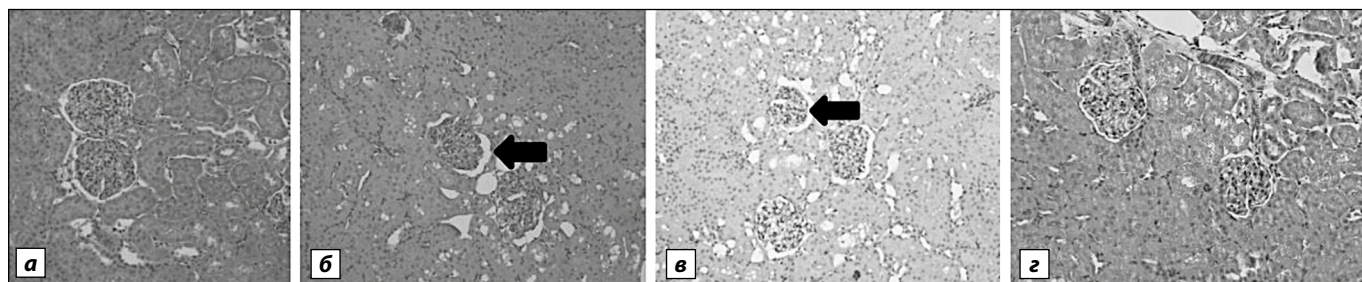


Рис. 1. Состояние паренхимы почки на ранних сроках после отравления параоксоном в дозе ЛД₈₄: а – контроль; б – 24 ч после отравления; в – 3 сут после отравления; з – 7 сут после отравления. Стрелками показано увеличение площади мочевого пространства. Гематоксилин-эозин. Ув. ×200.

Fig. 1. The state of the kidney parenchyma in the early stages after paraoxon poisoning at a dose of LD₈₄: а – control; б – 24 hours after poisoning; в – 3 days after poisoning; з – 7 days after poisoning. Arrows show an increase in the area of the urinary space. Hematoxylin-eosin. ×200.

ряли высоту эпителиальных клеток проксимальных и дистальных извитых канальцев, а также толщину ГБМ.

Полученные данные анализировали при помощи программ Microsoft Office Excel 2007 и SPSS Statistics 17.0. Проверку на нормальность распределения проводили с использованием теста Колмогорова–Смирнова. Достоверность полученных результатов определяли путем сравнения двух независимых выборок по уровню выраженности признака с применением непараметрического теста Краскела–Уоллиса и *U*-критерия Манна–Уитни. Отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При микроскопическом исследовании почек крыс выявлено повреждение эпителиальных клеток канальцев различной степени выраженности. Через 24 ч и 3 сут после отравления их цитоплазма становилась более гомогенной, зернистость, в норме присутствующая в клетках эпителия канальцев, терялась, что вызвано разобщением обменных процессов в эпителиальных клетках вследствие острой токсической нагрузки. Спустя 7 сут после отравления морфологические характеристики цитоплазмы полностью восстанавливались и визуально не отличались от группы контроля (рис. 1). Спустя 24 ч после отравления в группе ЛД₈₄ было выявлено увеличение диаметра просвета канальцев, а через 3 сут после отравления происходило его сокращение по отношению к контрольной группе.

На 7-е сутки после отравления эпителии восстанавливались и эти показатели уже не имели различий по сравнению с контролем. Одновременно отмечали колебание высоты эпителия проксимальных и дистальных канальцев. Выявлено снижение высоты эпителиальных клеток дистальных

канальцев спустя 24 ч в группе ЛД₈₄ и увеличение высоты эпителия проксимальных канальцев через 3 сут после отравления. В эпителии проксимальных канальцев повреждения были выражены локально и проявлялись в виде растяжения базального лабиринта, слущивания микроворсинок на апикальной поверхности и наличия пикнотических ядер в клетках. В эпителии дистальных канальцев наблюдались повреждения в виде частичного набухания и разрушения митохондрий, наличия пикнотических ядер и смещения ядер к апикальным поверхностям клетки (рис. 2).

К 7-м суткам сохранялись некоторые признаки разрушения эпителиальных клеток канальцев, перекрывание просветов канальцев клеточным детритом, а также локальное разрушение апикальных поверхностей клеток. Последнее неизбежно приводит к нарушению реабсорбции в канальцах. Известно, что в почках здоровых животных глюкоза полностью реабсорбируется в проксимальных канальцах. Транзиторная глюкозурия, выявленная при интоксикации крыс параоксоном в сублетальных дозах и проявляющаяся на фоне нормального уровня глюкозы в крови, может определяться вплоть до 8 нед после интоксикации [8]. Это указывает на неполное восстановление эпителия проксимальных канальцев спустя 7 сут после отравления, хотя микроскопические признаки повреждения на данном сроке уже не определяются.

В структуре почечного тельца через 24 ч после отравления в группах ЛД₅₀ и ЛД₈₄ было выявлено снижение отношения общего размера почечного тельца к площади клубочковых капилляров. Это говорит о растяжении капсулы Шумлянско–Боумена и увеличении площади мочевого пространства при острой токсической нагрузке. Такие изменения в почечном тельце регистрируются и к 3-м суткам после отравления, а спустя 7 сут отсутствуют.

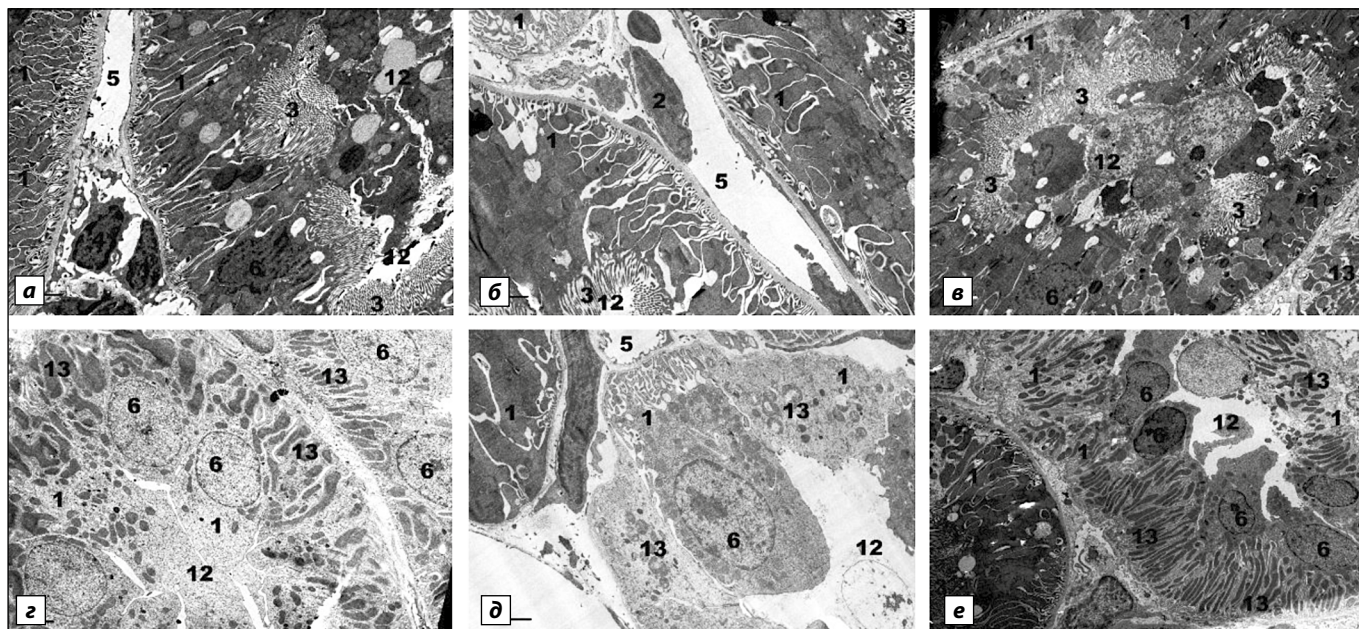


Рис. 2. Ультраструктура эпителиальных клеток: *a, б, в* – проксимальных; *г, д, е* – дистальных извитых канальцев почки; *a, г* – контроль; *б, д* – 24 ч после отравления; *в, е* – 7 суток после отравления.

1 – эпителиальная клетка; 2 – эндотелиальная клетка; 3 – микроворсинки; 4 – лейкоцит; 5 – просвет капилляра; 6 – ядро; 12 – просвет канальца; 13 – митохондрии.

Fig. 2. Ultrastructure of epithelial cells: *a, б, в* – proximal; *г, д, е* – distal convoluted tubules of the kidney; *a, г* – control; *б, д* – 24 h after poisoning; *в, е* – 7 days after poisoning.

1 – epithelial cell; 2 – endothelial cell; 3 – microvilli; 4 – leukocyte; 5 – capillary lumen; 6 – core; 12 – lumen of the tubule; 13 – mitochondria. Double contrasting with lead nitrate and uranyl acetate. Transmission electron microscopy, scale bar = 2 μ m.

Среди компонентов ФБП при ультраструктурном исследовании значительные специфические визуальные показатели для выявления повреждения отсутствовали. В мочевом пространстве содержался клеточный детрит в небольшом количестве. Электронно-плотных отложений по базальным мембранам или в мезангии не обнаруживалось, депозиты не определялись, просветы капилляров оказались свободны (рис. 3).

Тем не менее, при проведении морфометрии было выявлено увеличение толщины ГБМ в

группах ЛД₅₀ и ЛД₈₄ спустя 7 сут после отравления (рис. 4). Через 24 ч и 3 сут после отравления значимых отличий выявлено не было.

Синтез компонентов ГБМ требует участия как подоцитов, так и эндотелиальных клеток клубочковых капилляров [9]. Утолщение ГБМ способно привести к увеличению диффузии сквозь неё молекул малого и среднего размера, что в свою очередь вызовет рост плазменных концентраций различных веществ, создавая риск развития различных патологий. Например, увеличение

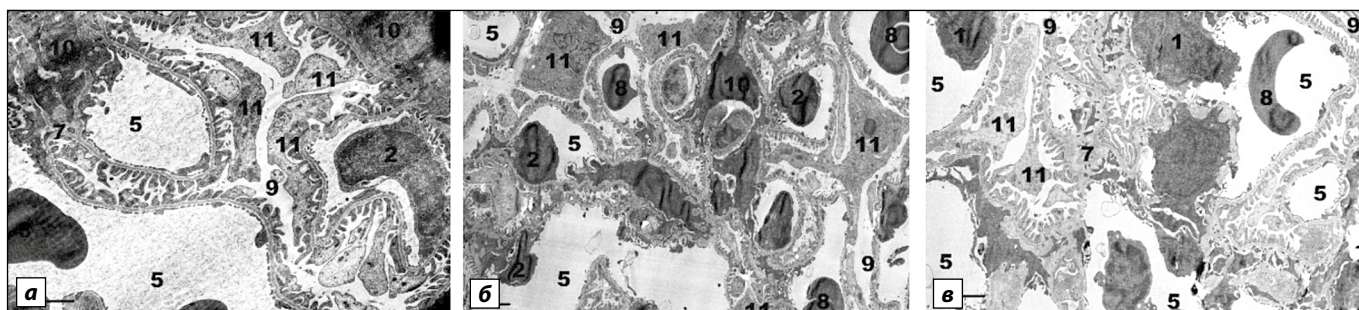


Рис. 3. Фрагменты почечных телец в контрольной и экспериментальных группах. *a* – контроль; *б* – 24 ч после отравления; *в* – 7 сут после отравления. 2 – эндотелиальная клетка; 5 – просвет капилляра; 7 – ГБМ 8 – эритроцит; 9 – мочевое пространство; 10 – мезангиальный матрикс; 11 – подоцит. Двойное контрастирование нитратом свинца и уранилацетатом.

Трансмиссионная электронная микроскопия. Масштабный отрезок = 2 μ m.

Fig. 3. Fragments of renal corpuscles in the control and experimental groups. *a* – control; *б* – 24 hours after poisoning; *в* – 7 days after poisoning. 2 – endothelial cell; 5 – capillary lumen; 7 – GBM 8 – erythrocyte; 9 – urinary space; 10 – podocyte. Double contrasting with lead nitrate and uranyl acetate. Transmission electron microscopy. Scale bar = 2 μ m.

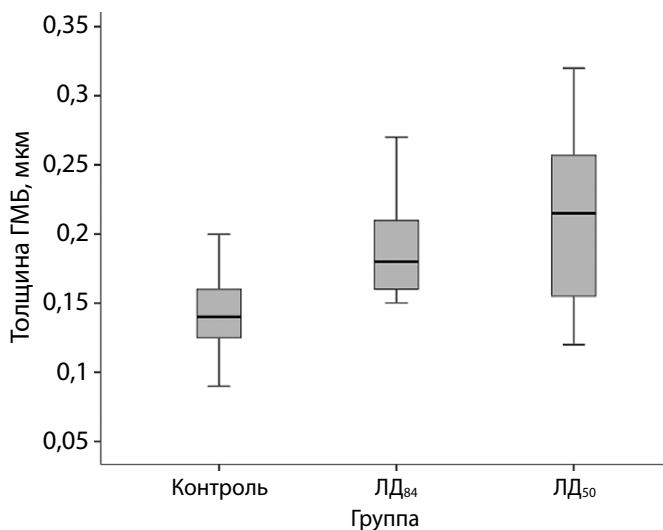


Рис. 4. Медианы распределения данных морфометрических показателей толщины ГМБ, полученных при ультрамикроскопическом исследовании в группе ЛД₅₀ и ЛД₈₄ спустя 7 сут после отравления, мкм.

Fig. 4. Distribution medians of data on morphometric parameters of GBM thickness obtained by ultramicroscopic examination in the LD₅₀ and LD₈₄ groups 7 days after poisoning, μm .

толщины ГМБ является одним из проявлений диабетической нефропатии, развивающейся в течение нескольких лет до того, как станут очевидными клинические проявления [5, 10]. То, что спустя 7 сут после отравления параоксоном в дозах ЛД₅₀ и ЛД₈₄ происходит утолщение ГМБ может быть вызвано активным синтезом подоцитами и эндотелиальными клетками клубочковых капилляров компонентов мембраны в ответ на повреждение, вероятно, для снижения токсической нагрузки. По данным литературы, повышение уровня экскреции гликозаминогликанов, основных структурных компонентов ГМБ, в результате отравления параоксоном сохраняется на сроке от 3 сут до 12 нед после отравления [8]. Также при тяжёлых нарушениях метаболизма, например при

сахарном диабете, изменяется их нормальный состав в базальных мембранах и эндотелии сосудов. Механизмы развития этих изменений окончательно не выяснены [5, 11]. Выявленные нами морфологические признаки свидетельствуют о том, что в результате однократного воздействия параоксона в изученных дозах первоначально повреждение затрагивает эпителиальные клетки проксимальных и дистальных извитых канальцев почки, за которым следует неполное восстановление с отсутствием признаков повреждения на микроскопическом уровне спустя уже 7 сут после отравления. Основной риск при отравлении параоксоном — изменения, затрагивающие ФБП, несущие в себе опасность развития хронической патологии и требующие исследования на более отдалённых сроках после отравления.

Заключение

Проведена оценка повреждения почек животных на ранних сроках после отравления параоксоном в дозах ЛД₅₀ и ЛД₈₄. Показано, что в первую очередь воздействие токсической нагрузки приходится на эпителиальные клетки извитых канальцев. Изменения в этих клетках носят реактивный и компенсаторный характер, о чем свидетельствует отсутствие признаков повреждения на микроскопическом уровне спустя 7 сут после отравления. Одновременно с этим увеличение нагрузки на компоненты фильтрационного аппарата почек способно запускать патологические механизмы, приводящие к структурным повреждениям, последствия которых могут проявиться спустя длительное время. Показано, что последствия морфологических изменений в тканях почек при отравлении ФОС сходны по своим проявлениям с начальными стадиями диабетической нефропатии. Характер выявленных изменений в фильтрационном аппарате почек, а именно увеличение толщины ГМБ требует дальнейшего исследования на более отдалённых сроках после отравления.

ЛИТЕРАТУРА

(п.п. 1–7, 9, 10 см. References)

8. Соболев В.Е., Корф Е.А., Гончаров Н.В. Крыса (*Rattus norvegicus*) как объект исследования в модели острого отравления фосфорорганическими соединениями. Морфофункциональные изменения почек. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2019; 55(4): 272–21.
9. Крюков Е.В., Дацко А.В., Потехин Н.П., Саркисов К.А., Борисов А.Г., Петрова О.Н., Корякин С.В. Хроническая болезнь почек как фактор, влияющий на определение годности к военной службе. *Военно-медицинский журнал*. 2021; 342(3): 31–7.
1. Satar S., Satar D.A., Mete U.O., Suchard J., Topal M., Kaya M. Ultrastructural effects of acute organophosphate poisoning on rat kidney. *Renal Failure*. 2005; 27: 623–7.
2. Valcke M., Levasseur M.-E., Silva A.S., Wesseling C. Pesticide exposures and chronic kidney disease of unknown etiology: an epidemiologic review. *Environmental Health*. 2017; 16(49): 1–20.
3. Cavari Y., Landau D., Sofer S., Leibson T., Lazar I. Organophosphate Poisoning-Induced Acute Renal Failure. *Pediatric emergency care*. 2013; 29: 646–7.
4. Kaya Y., Bas O., Hanci H., Cankaya S., Nalbant I., Odaci E. et al. Acute renal involvement in organophosphate poisoning: histological and immunochemical investigations. *Renal Failure*. 2018; 40: 410–5.

REFERENCES

<https://doi.org/10.47470/0869-7922-2022-30-4-231-237>

Оригинальная статья

5. Marshall C.B. Rethinking glomerular basement membrane thickening in diabetic nephropathy: adaptive or pathogenic? *Physiol. Renal Physiol.* 2016; 311(5): 831-43.
6. Gu X., Zhang S., Zhang T. Abnormal Crosstalk between Endothelial Cells and Podocytes Mediates Tyrosine Kinase Inhibitor (TKI)-Induced Nephrotoxicity. *Cells.* 2021; 10(869): 1–20.
7. Yokota K., Fukuda M., Katafuchi R., Okamoto T. Nephrotic syndrome and acute kidney injury induced by malathion toxicity. *BMJ Case Rep.* 2017; 9: bcr2017220733.
8. Sobolev V.E., Korf E.A., Goncharov N.V. Rat (*Rattus Norvegicus*) as an Object of Research in the Model of Acute Poisoning with Organophosphates. Morphofunctional Changes of Kidneys. *Zhurnal evolyucionnoj biohimii i fiziologii.* 2019; 55(4): 272–81. (in Russian)
9. Thomas B., Batuman V. What is the role of the glomerular basement membrane (GBM) in the pathophysiology of proteinuria? (2020) Available at: <https://www.medscape.com/answers/238158-93493> (accessed 5 March 2020).
10. Scott R.P., Quaggin S.E. Formation and Maintenance of a Functional Glomerulus. In: *Kidney development disease repair and regeneration.* Amsterdam: 2016; 103–19.
11. Kryukov E.V., Dacko A.V., Potekhin N.P., Sarkisov K.A., Borisov A.G., Petrova O.N., Koryakin S.V. Chronic kidney disease as a factor affecting the determination of the category of fitness for military service. *Voенно-медицинский журнал.* 2021; 342(3): 31–7. (in Russian)

ОБ АВТОРАХ:

Соколова Маргарита Олеговна (Sokolova Margarita Olegovna), аспирант ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН; младший научный сотрудник научно-исследовательского центра Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова, г. Санкт-Петербург. E-mail: sokolova.rita@gmail.com

Соболев Владислав Евгеньевич (Sobolev Vladislav Evgenievich), доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории сравнительной биохимии ферментов ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, г. Санкт-Петербург. E-mail: vesob@mail.ru

Гончаров Николай Васильевич (Goncharov Nikolai Vasilevich), доктор биологических наук, заведующий лабораторией сравнительной биохимии ферментов ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, г. Санкт-Петербург. E-mail: ngoncharov@gmail.com

