УДК 597–15:[597–1.044:597–12]

DOI: 10.21779/2542-0321-2018-33-4-121-128

В.Н. Крючков¹, Н.Б. Бутаева², Х.Г. Омарова², А.В. Дубовская³

Влияние экспериментальной интоксикации кадмием на морфофункциональные показатели почек рыб

¹ Астраханский государственный технический университет; Россия, 414056, г. Астрахань, ул. Татищева, 16; lobster1212@mail.ru;

² Дагестанский государственный университет; Россия, 367001, г. Махачкала, ул. М. Гаджиева, 43а; butaeva.nar@yandex.ru;

³ КаспНИРХ; Россия, 414056, г. Астрахань, ул. Савушкина, 1; anisdu@mail.ru

Проведено изучение механизма действия кадмия на карповых рыб. Показано, что содержание рыб в воде с кадмием в концентрации 0,05 мг/л вызывает накопление металла в органах и тканях, особенно в почках. Через четыре недели содержание кадмия в тканях почки превысило его первоначальный уровень более чем в 6 раз. Одновременно было показано, что кадмий достаточно долго остаётся в почках по сравнению с другими тканями, например с мышечной. Накопление металла сопровождается изменениями в почках, преимущественно в извитых канальцах. В почечном тельце обнаружена гиперклеточность капилляров клубочка. При электронной микроскопии было выявлено нарушение морфологии подоцитов, а также неравномерное утолщение базальной мембраны эндотелия капилляров.

Было установлено достоверное увеличение содержания иммуноглобулинов и циркулирующих иммунных комплексов в крови карпа при экспериментальной интоксикации кадмием. Антисыворотка против антигенов почки была получена иммунизацией мышей с неполным адъювантом Фрейнда. Реакция коагуляции со стабилизированным *Staphylococcus aureus* показала появление в крови карпа иммуноглобулинов, специфичных к тканям почки рыб, подвергнутым действию кадмия. Были выявлены функциональные нарушения выделительной системы, прежде всего в виде ануреза. После отравления кадмием в концентрации 0,25 мг/л суточный объем мочи уменьшился почти в два раза при одновременном увеличении осмолярности мочи в три раза.

Сделан вывод, что кадмий обладает выраженной способностью накапливаться в почках рыб, что приводит морфологическим нарушениям и к дисфункции почек.

Ключевые слова: кадмий, почки, интоксикация, морфологические изменения, иммуноглобулины.

Введение

Токсичность кадмия хорошо известна, и одно его свойств заключается в том, что он вызывает нарушения во многих системах органов водных организмов в очень низких концентрациях [9].

Кадмий в водоёмах дельты Волги находится в концентрациях порядка 1–2 мкг/л. По результатам мониторинговых исследований, проведённых нами в 90-х годах, было установлено, что у карповых рыб кадмий накапливается преимущественно в почках, где его содержание может достигать более 2,0 мг/кг, при этом превышая накопление в других органах и тканях [4]. Одновременно с этим было выявлено, что при накоплении

кадмия в почках рыб в концентрации 1 мг/кг и выше в последних наблюдались патологические изменения, которые при меньших накоплениях металла не обнаруживались либо проявлялись в меньшей степени [7].

Исследования, проведенные ранее на теплокровных животных, показывают значение кадмия при развитии патологии почек [13], причём патология почек в виде дисфункции почечных канальцев и хронического интерстициального фиброза наблюдалась в случаях, когда концентрации кадмия в коре почек превышают критический уровень 200 мкг/г [12]. Ряд исследователей произвели изучение изменений в почках, вызванных экспериментальным воздействием кадмия [15, 16, 17]. Были описаны изменения в стенках извитых канальцев, в Боуеновой капсуле, выявлялись обширные очаги коагуляционного некроза и гнойного воспаления. Однако исследований на клеточном уровне выполнено относительно немного.

Известно, что иммунным процессам принадлежит ведущая роль в развитии многих форм почечной патологии [3]. Показано, в частности, развитие иммунного ответа при пролиферативной болезни почек лососёвых рыб [11]. Вместе с тем вопросы развития почечной патологии при интоксикации кадмием и протекание тех или иных процессов в иммунной системе у рыб практически не отражены в доступной нам литературе.

Целью настоящей работы было изучение механизмов токсического поражения почек рыб при воздействии кадмия.

Материал и методы исследований

В качестве объекта экспериментального исследования использовался беспородный карп массой от 20 до 40 г. Длительность экспериментов с рыбами составляла в зависимости от конкретной задачи до 60 суток, концентрация кадмия – от 0,05 до 0,50 мг/л.

Накопление кадмия в тканях определяли методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии.

Морфологическое изучение состояния почек проводилось с использованием традиционных гистологических методов: заливка в парафин-целлоидин, окраска гематоксилин-эозином [8]. Анализ и фотографирование микропрепаратов осуществлялись на микроскопе «Olympus BH-2».

Для электронно-микроскопического исследования почки рыб фиксировались в глютаровом альдегиде на кокодилатовом буфере (рН 7,3) с дофиксацией в забуференном 1%-ном растворе тетроксид осмия. После проводки через этанол возрастающей концентрации ткани заключали в аралдит. Анализ срезов осуществляли под электронным микроскопом JEM 100CX.

Антитела (АТ) к почечным белкам рыб как контрольных, так и подвергшихся отравлению кадмием, получали путем иммунизации мышей. Предварительно готовили экстракт тканей почек рыб по обычной схеме [1]. Иммунизацию мышей проводили однократно, антиген вводили одновременно внутримышечно и подкожно с неполным адъювантом Фрейнда. Кровь у мышей отбирали на 10-е сутки после иммунизации.

Выявление антител к «нормальным» и к «измененным» почкам проводили с помощью реакции коаггутинации. Предварительно готовился диагностикум. Стабилизированные *Staphylococcus aureus* штамм Cowan 1 в количестве 1,0 мл 10%-ной взвеси смешивали с иммунной сывороткой. Взвесь с сорбированными антигенами отмывали фосфатным буфером (рН = 7,2) от несвязавшихся иммуноглобулинов. Готовили два ви-

да диагностикумов: 1 – содержащий антитела к нормальным, неповрежденным тканям почек рыб (А); 2 – содержащий антитела к неповрежденным тканям почек и к тканям почек, поврежденных кадмием (В).

Белковый антиген, содержащий нормальные и поврежденные кадмием белки, истошчили диагностикумом «А» для получения раствора антигена, содержащего только белки, измененные кадмием.

Для изучения функции почек рыб (карпа) отбиралась в течение суток выделяемая моча при помощи приспособления оригинальной конструкции, минимально травмирующей рыбу. Осмолярность мочи определяли криоскопическим методом на осмометре «ОМКА-1Ц». В качестве стандарта применяли раствор NaCl концентрацией 400 ммоль/кгH₂O.

Результаты и обсуждение

Содержание рыб в воде с кадмием в концентрации 0,05 мг/л вызвало увеличение содержания металла в органах и тканях. Так, через 2 недели эксперимента концентрация в жабрах увеличилась в 2,4 раза, в мышцах – в 1,5 раза, а почках – в 1,9 раза.

В течение следующих двух недель скорость накопления кадмия в мышцах уменьшилась, его концентрация увеличилась по сравнению с началом эксперимента в 1,8 раз. Что касается накопления кадмия в почках, то скорость накопления возросла, и первоначальный уровень содержания металла был превышен более чем в 6 раз, составив величину $4,11 \pm 0,11$ мг/кг при первоначальном значении $0,61 \pm 0,03$ мг/кг.

Характер выведения кадмия из различных тканей карпа имел ряд особенностей. При содержании рыбы в чистой воде в течение двух недель содержание кадмия в жабрах уменьшилось до практически первоначального значения. В мышцах наблюдалось уменьшение концентрации металла, но выше тех значений, которые отмечались в начале эксперимента. Что касается почек, то через две недели второй части эксперимента концентрация кадмия практически не изменилась. В дальнейшем мы наблюдали снижение концентрации, но и через месяц содержания подопытных рыб в чистой воде уровень накопления кадмия в почке превышал первоначальный более чем в 2 раза.

Отмеченное первоначальное интенсивное снижение уровня накопления кадмия в жабрах мы связываем с уменьшением содержания кадмия в эпителии филамента и ламелл. Как правило, обнаруживается положительная корреляция между концентрацией металлов в воде и содержанием в жабрах [7]. Кроме того, жаберный эпителий обладает большой способностью к регенерации; таким образом, клетки, вновь образовавшиеся, когда рыба находилась уже в чистой воде, содержали меньше кадмия. Дальнейшее уменьшение скорости выведения кадмия из жабр, по-видимому, связано с медленным выведением кадмия из костной ткани жабр.

Таким образом, кадмий достаточно долго остаётся в почках по сравнению с другими тканями, например с мышечной.

Каким образом развиваются изменения в почках при экспериментальной кадмиевой интоксикации было подробно описано в соответствующей работе [5]. Отметим, что гистологическому анализу были подвергнуты почки рыб при среднем уровне накопления кадмия 3,5 мг/кг сухой массы. Морфологические изменения в мезонефросе выражались в виде нарушений микроциркуляции (гемо- и плазморрагии) и изменений нефронов. На светооптическом уровне выявлялись изменения преимущественно извитых канальцев. В почечных тельцах отмечалась гиперклеточность капилляров клубочка, при этом капиллярные петли полностью заполнили всю полость почечной капсулы, от-

существовало мочевое пространство. Морфометрический анализ показал достоверное изменение ряда показателей в почках рыб после кадмиевой интоксикации (таблица 1).

Таблица 1. Морфометрические параметры почек карпа после воздействия кадмия

Параметры	Контроль	Кадмий (0,1 мг/л)
Диаметр почечной капсулы, мкм	66,9±3,2	77,4±4,2*
Диаметр капиллярного клубочка, мкм	53,1±5,0	67,3±5,3*
Количество клеток в сосудистом клубочке	52,3±2,1	63,7±4,1*
Высота эпителия париетального листка капсулы, мкм	4,4±0,6	4,4±0,2
Диаметр канальцев 1 типа, мкм	21,8±0,8	26,0±1,0*
Диаметр канальцев 2 типа, мкм	69,4±1,3	76,0±2,7
Диаметр канальцев 3 типа, мкм	46,2±2,4	46,7±1,7
Площадь межканальцевой ткани, %	60,1±0,3	59,6±0,4

*– величины, достоверно отличающиеся от контроля по критерию Стьюдента, $P<0,05$.

Из таблицы видно, что явно выраженные изменения произошли с элементами почечного тельца. При этом отметим, что увеличение количества клеток в сосудистом клубочке произошло преимущественно за счёт увеличения количества эритроцитов, из чего следует, что в капиллярах имело место нарушение циркуляции крови. Размер сосудистого клубочка увеличился, в т. ч. и за счёт увеличения объёма, который занимали мезангиальные клетки. Это отчётливо было видно на полутонких срезах (рис. 1). Кроме того, в отдельных случаях можно было наблюдать пролиферацию париетального эпителия. О пролиферативных процессах при болезнях почек у рыб говорят и М. Palikova с соавторами [14]. Электронная микроскопия показала упрощение архитектоники подоцитов, а также неравномерное утолщение базальной мембраны эндотелия капилляров.

Рис. 1. Почка карпа. Полутонкий срез. Толуидиновый синий. Увеличение x 1000

Ранее в серии опытов нами была исследована динамика содержания иммуноглобулинов и циркулирующих иммунных комплексов в крови карпа при интоксикации кадмием [6]. При этом было установлено достоверное увеличение данных показателей при экспериментальной интоксикации кадмием. О роли иммунных процессов в развитии и течении почечной патологии у рыб отмечается и в ряде новых публикаций [14, 11].

Разумеется, возникает вопрос: чем было вызвано появление иммуноглобулинов, поскольку кадмий как элементарное вещество не обладает свойствами антигена.

Результаты исследования антигенных свойств «нормальных» почек и условно названных «измененными» показаны в таблице 2.

Таблица 2. Результаты реакции коаглютинации с антигенами, содержащими «нормальные» и «измененные» белки почек рыб

№	Антиген	Сыворотка	Реакция
1	Содержит только нормальные белки почек	Содержит АТ к нормальным белкам	+
2	Содержит белки, измененные кадмием (после истощения)	Содержит АТ к нормальным белкам	–
3	Содержит только нормальные белки почек	Содержит АТ к измененным белкам и нормальным	+
4	Содержит белки, измененные кадмием (после истощения)	Содержит АТ к измененным белкам и нормальным	+

Анализируя результаты этих реакций, можно сделать вывод о различных антигенных свойствах «нормальных» и «измененных» кадмием почек рыб.

Сообщения о роли кадмия в развитии патологии почек достаточно часто встречаются в публикациях. Так, с помощью иммунного анализа D. Smith и соавторы [18] показали возможность развития вторичного гломерулонефрита после повреждения почек ртутью, висмутом, кадмием. Имеются сообщения об образовании соединений металл-белок при поступлении в организм кадмия [10].

Как отмечалось, интоксикация рыб кадмием приводит к выраженным гломерулярным и тубулярным изменениям. Функциональные нарушения проявлялись, прежде всего, в виде ануреза. Так, если в норме у карпа массой 20–25 г за сутки выделялось в среднем $4,22 \pm 0,21$ мл мочи, то после отравления кадмием в концентрации 0,25 мг/л суточный объем мочи составил $2,62 \pm 0,18$ мл. При этом осмолярность мочи увеличилась почти в три раза и составила $36,0 \pm 3,1$ ммоль/кг вместо $12,5 \pm 0,64$ ммоль/кг у контрольных рыб. В осадке мочи обнаруживались цилиндры, слущенные эпителиальные клетки. Качественная реакция на белок давала положительный результат.

Таким образом, кадмий обладает выраженной способностью накапливаться в почках рыб. Вызываемые им нарушения проявляются в развитии морфологических нарушений, особенно в извитых канальцах, и в дисфункции почек. Выяснение роли иммунных процессов в развитии почечной патологии требует дальнейших исследований.

Выводы

1. Установлено, что экспериментальная интоксикация кадмием приводит к морфологическим изменениям в почках, которые проявляются в виде увеличения размеров почечной капсулы, капиллярного клубочка и количества клеток в сосудистом клубочке. Выявлено утолщение базальной мембраны эндотелия капилляров.
2. Показано, что почки карпа после интоксикации кадмием по своим антигенным свойствам отличаются от почек интактных рыб.
3. Выявлено, что морфологические изменения почек, вызванные экспериментальной интоксикацией кадмием, сопровождаются функциональными нарушениями в виде снижения эффективности клубочковой фильтрации.

Литература

1. Антитела. Методы: кн. 1 / под ред. Д. Кэти. – М.: Мир, 1991. – 287 с.
2. Винниченко Л.Н. Сравнительная ультраструктура нефрона. – Л.: Наука, 1980. – 136 с.
3. Дранник Г.Н. Иммунонефрология. – Киев: Здоровья, 1989. – 184 с.
4. Зайцев В.Ф., Григорьев В.А., Крючков В.Н. Особенности распределения тяжелых металлов в органах и тканях туводных видов ихтиофауны Волго-Ахтубинской поймы // Вестник Астраханского технического института рыбной промышленности и хозяйства. – М., 1993. – С. 69–71.
5. Крючков В.Н. Морфогенез токсического поражения туловищной почки рыб под влиянием кадмия // Российские морфологические ведомости. – 2000. – № 3–4. – С. 83–87.
6. Крючков В.Н., Бойко А.В. Изучение механизма нефротоксичности кадмия для рыб // Современные проблемы Каспия: Материалы Междунар. конф., посв. 105-летию КаспНИРХ, Астрахань, 2002. – Астрахань: Изд-во КаспНИРХ, 2002. – С. 152–155.
7. Крючков В.Н., Нгуен Ван Хао, Мохамед Саид Ахмед, Федорова Н.Н. Патологические изменения в почках карповых рыб при накоплении кадмия // Тез. докл. научно-

практической конференции по экологическим проблемам сельского и водного хозяйства Поволжья, (Саратов, 22–24 сентября, 1992). – Саратов, 1992. – С. 55.

8. Ромейс Б. Микроскопическая техника. – М.: Иностранная литература, 1953. – 720 с.

9. Сухачев В.А., Лапытько Е.И., Ядренкин А.В., Фалеев В.И., Литвинов Ю.Н., Новиков Е.А., Торопов К.В., Мошкин М.П. Загрязнение ртутью и другими тяжелыми металлами водных и наземных биоценозов // Поведение ртути и других тяжелых металлов в экосистемах. – Новосибирск, 1989. – Ч. 2. – С. 101–114.

10. Andersen R.A., Daas H.L., Mikalsen A., Alexander J. Occurrence of various forms of metallothionein in the rat after a short-term cadmium injection regimen // *Comp. Biochem. and Physiol.* – 1989. – V. 93, № 2. – P. 367–375.

11. Bailey C., Strepparova N., Wahli T., Segner H. Exploring the immune response, tolerance and resistance in proliferative kidney disease of salmonids // *Developmental and Comparative Immunology*. – 2019. – V. 90. – P. 165–175.

12. Goyer R.A. Mechanisms of lead and cadmium nephrotoxicity // *Toxicol. Lett.* – 1989. – V. 46, № 1–3. – P. 153–162.

13. Nicholson Jeremy K., Higham Denise P., Timbrell John A., Sadler Peter J. Quantitative high resolution H-NMR urinalysis studies on the biochemical effects of cadmium in the rat // *Mol. Pharmacol.* – 1989. – V. 36, № 3. – P. 398–404.

14. Palikova M., Papezikova I., Markova Z., Navratil S., Mares J., Mares L., Vojtek L., Hyrs P., Jelinkova T., Schmidt-Posthaus H. Proliferative kidney disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under intensive breeding conditions: Pathogenesis and haematological and immune parameters // *Veterinary Parasitology*. – 2017. – V. 238. – P. 5–16.

15. Pouretezadi S., Wingert R. Little fish, big catch: zebrafish as a model for kidney disease // *Kidney International*. – 2016. – V. 89, Issue 6. – P. 1204–1210.

16. Prasada Rao P.V., Jordan S.A., Bhatnagar M.K. Combined nephrotoxicity of methylmercury, lead, and cadmium in Pekin ducks: metallothionein, metal interactions, and histopathology // *J. Toxicol and Environ Health*. – 1989. – V. 26, № 3. – P. 327–348.

17. Singhal R.N., Jain M. Cadmium-induced changes in the histology of kidneys in common carp, *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) // *Bull. Environ. Contam. And Toxicol.* – 1997. – V. 58, № 3. – P. 456–462.

18. Smith D.M., Pircock J.A., Murphy W.M. Aluminium-containing Dense Deposits of the glomerular Basement Membrane // *Am. J. Clin. Path.*, 1982. – V. 77, № 3. – P. 341–346.

Поступила в редакцию 29 октября 2018 г.

UDC 597–15:[597–1.044:597–12]

DOI: 10.21779/2542-0321-2018-33-4-121-128

The effect of experimental intoxication with cadmium on the morphological and functional indicators of kidneys of fish

V.N. Kryuchkov¹, N.B. Butaeva², H.G. Omarova², A.V. Dubovskaya³

¹ Astrakhan State Technical University; Russia, 414056, Astrakhan, Tatichev st., 16; lobster1212@mail.ru;

² Dagestan State University; Russia, 367001, Makhachkala, M. Gadzhiev st., 43a; butaeva.nar@yandex.ru;

³ CaspNIRKh; Russia, 414056, Astrakhan, Savushkin st., 1; anisdu@mail.ru

The study of the mechanism of *штадгугтс* of cadmium on carp fish was made. It was shown that the content of fish in water with cadmium at a concentration of 0.05 mg / l causes metal accumulation in organs and tissues, especially in the kidneys. Four weeks later, the content of cadmium in the tissues of the kidney exceeded its initial level by more than 6 times.

At the same time it was shown that cadmium remains in the kidneys for a long time compared with other tissues, for example, with muscle tissue. The accumulation of metal is accompanied by changes in the kidneys, mainly in convoluted tubules. Hypercellularity of glomerular capillaries was found in therenal body. Pre electron microscopy revealed a violation of the podocyte morphology, as well as an uneven thickening of the basement membrane of the capillary endothelium.

The significant increase in the content of immunoglobulins and circulating immune complexes in the blood of carp was found during experimental intoxication with cadmium. Anti serum against kidney antigens was obtained by immunizing mice with incomplete Freund's adjuvant. The coagglutination reaction with stabilized *Staphylococcus aureus* showed the appearance in the blood of carp immunoglobulins specific to the kidney tissues of fish exposed to cadmium. Functional disorders of the excretory system were detected, primarily in the form of anuresis, after cadmium poisoning at a concentration of 0.25 mg / l, the daily volume of urine decreased almost twice, while simultaneously increasing the urine osmolarity three times.

The study has shown that cadmium has the ability to accumulate in the kidneys of fish, which leads to morphological disorders and to kidney dysfunction.

Keywords: *cadmium, kidney, intoxication, morphological changes, immunoglobulins.*

Received 29 October, 2018