

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОЧЕК И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ И МОЧИ КРЫС ПРИ ОСТРОЙ ИНТОКСИКАЦИИ O,O-ДИЭТИЛ-O-(4-НИТРОФЕНИЛ)ФОСФАТОМ

© 2022 г. М. О. Соколова^{1,2,*}, В. Е. Соболев¹, Н. В. Гончаров¹

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: sokolova.rita@gmail.com

Поступила в редакцию 06.07.2022 г.

После доработки 20.09.2022 г.

Принята к публикации 20.09.2022 г.

Пестициды на основе фосфорорганических соединений (ФОС) широко используются в сельском хозяйстве по всему миру, что сопряжено с риском острых и хронических отравлений человека. В целом токсическое воздействие ФОС на организм млекопитающих достаточно хорошо изучено, однако многие детали этиологии срочных и отдаленных последствий интоксикации требуют дополнительного внимания. Цель исследования — оценка биохимических показателей крови и мочи крыс, наряду с патоморфологическими и ультраструктурными изменениями почек, в динамике после острого отравления экспериментальных животных O,O-диэтил-O-(4-нитрофенил)фосфатом (этил-параоксон, ДНФФ).

Исследование выполнено на белых аутбредных крысах-самцах *Rattus norvegicus*, массой 200–250 г. ДНФФ в дозе ЛД50 животным экспериментальных групп вводили однократно. Образцы сыворотки крови и мочи для биохимического анализа и тканей почек для морфологического исследования отбирали через сутки, 3 и 7 сут после отравления. Оценивали суточный диурез и удельный вес мочи, в сыворотке крови и в моче — содержание билирубина, общего белка, глюкозы, рН, креатинина, альбумина, D-3-гидроксипутирата и мочевой кислоты. Описывали патоморфологические изменения в тканях почек.

В сыворотке крови крыс при воздействии ДНФФ наблюдаются снижение альбумина, повышение концентрации мочевой кислоты, глюкозы и D-3-гидроксипутирата. Отмечено снижение объема суточного диуреза и рН мочи, при одновременном увеличении ее удельного веса. Выявлены повреждение эпителиальных клеток проксимальных извитых канальцев почек через сутки и увеличение толщины гломерулярных базальных мембран через 7 суток после воздействия.

Однократное введение сублетальных доз ДНФФ оказывает нефротоксический эффект, проявляющийся в изменении соответствующих биохимических показателей крови, мочи и морфологических показателей тканей почек. Наиболее выраженные изменения биохимических показателей зарегистрированы через сутки после воздействия ДНФФ и свидетельствуют о снижении выделительной способности почек и развитии метаболического кетоацидоза. Утолщение гломерулярных базальных мембран через 7 суток после воздействия указывает на предпосылки к формированию отставленной патологии.

Ключевые слова: органофосфаты, крысы, биохимия, нефротоксичность, гломерулярная базальная мембрана, электронная микроскопия, извитые канальцы, нефропатия

DOI: 10.31857/S0044452922060110

Пестициды на основе фосфорорганических соединений (ФОС) являются высокотоксичными соединениями, которые на протяжении десятилетий широко используются в сельском хозяйстве по всему миру. Так, в США ежегодное количество хлорпирифоса, используемое при выращивании кукурузы, сои и других культур, в последние годы составляет около 4 тыс. тонн [1]. Помимо хлорпирифоса, в странах третьего мира

широко используют малатион и паратион [2]. В организме млекопитающих под действием монооксигеназ печени тионы преобразуются в оксоны, и параоксон является наиболее токсичным из них. Воздействие ФОС присутствует в этиологии множества нейродегенеративных, сердечно-сосудистых, респираторных, желудочно-кишечных, эндокринных, диабетических заболеваний и заболеваний почек [3–7]. Основным механизмом их

токсического действия на отравленный организм является угнетение активности фермента ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в нейромышечных и нейрональных холинэргических синапсах [8]. Для острого отравления различными ФОС были описаны гистологические и ультраструктурные изменения тканей почек, выражающиеся в дегенерации почечных гломерул, кровоизлияниях в капсуле Шумлянского–Боумена, растяжении просветов почечных канальцев, гидропических изменениях в эпителиальных клетках канальцев и множественных кровоизлияниях в интерстиции почки [9, 10]. На ранних сроках после острого отравления в тканях почек выявляется дезорганизация, проявляющаяся в нарушении целостности эпителиальных клеток и растяжении просвета канальцев [10, 11]. Однако механизмы, опосредующие повреждение функциональных структур почки и напрямую влияющие на сохранность их функции, до конца не выяснены. Одними из факторов токсических повреждений тканей являются изменение редокс-баланса и возникновение оксидативного стресса, связанного с истощением глутатиона и усилением перекисного окисления липидов (ПОЛ) [12, 13]. Роль оксидативного стресса в патофизиологии отравления ФОС активно обсуждается, но степень вклада активных форм кислорода (АФК) в токсическую роль ФОС в настоящее время не определена [13, 14]. ФОС и состояние холинэргического криза обуславливают гиперактивацию ряда сигнальных путей и, как следствие, развитие оксидативного стресса через производство АФК, индукцию ПОЛ, окисление белков и нуклеиновых кислот, в конечном счете – перерождение или гибель клеток [3, 13].

Необходимо отметить, что ФОС обладают уникальным профилем токсичности [2, 15]. Так, например, поступление дихлорфоса в организм не приводит к развитию выраженного оксидативного стресса [15]. Оценка динамики биохимических показателей крови и мочи при остром отравлении ФОС способна прояснить механизмы интоксикации. Исследование уровней активности холинэстеразы, амилазы, липазы и креатинфосфокиназы плазмы крови при остром воздействии позволило получить новые данные о степени тяжести повреждения, имеющие диагностическую ценность в случаях острого отравления человека [16]. Так как параоксон и его аналоги являются естественными метаболитами некоторых ФОС, используемых в настоящее время, то вполне резонно будет оценить изменение биохимических показателей крови и мочи в ответ на его острое воздействие в модели на животных [17]. Ранее мы описали три модели острого отравления крыс, с учетом высокого уровня карбоксилэстеразной активности в плазме крови грызунов [11, 18–20]. В этих работах, несмотря на их безусловный масштаб и принципиальную новизну по целому ряду критериев, были опреде-

ленные недостатки, один из которых – отсутствие комплексного исследования в одном эксперименте динамики биохимических показателей мочи и плазмы или сыворотки крови у одних и тех же животных в сочетании с исследованием морфологического субстрата наблюдаемых функциональных изменений. Цель настоящей работы состояла в дальнейшем изучении механизмов поражения почек при острой интоксикации органофосфатами на примере ДНФФ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на белых беспородных крысах-самцах *Rattus norvegicus*, массой 200–250 г ($n = 42$). Протокол исследования соответствует Директиве ЕС 2010/63/EU по проведению экспериментов на лабораторных животных и был одобрен Этическим комитетом Института эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова Российской академии наук (этическое разрешение № 13-к-а от 15 февраля 2018 г.).

Животные были разделены на 2 группы, одна из которых служила интактным контролем, тогда как крысам второй группы вводили подкожно (п/к) ДНФФ в дозе ЛД₅₀. Животным контрольной группы вводили 1 мл 0.9% раствора NaCl.

Пробы мочи и крови (пункция хвостовой вены) получали через сутки, 3 и 7 сут после воздействия. Исследования проводили на анализаторе мочи Combilyzer 13 (Human GmbH, Германия) и биохимическом анализаторе Sapphire (Hiroshe Electronic System Co., Япония) согласно инструкции производителя. Определяли суточный диурез, удельный вес мочи, уровень билирубина, общего белка, глюкозы, рН, креатинина, альбумина, D-3-гидроксибутирата и мочевой кислоты. В сыворотке крови определяли содержание амилазы, лактата, мочевой кислоты, общего билирубина, креатинина, триглицеридов, мочевины, общего белка, глюкозы, альбумина и D-3-гидроксибутирата.

Образцы почек для гистологического и ультрамикроскопического исследования брали у животных, погибших в течение 1-го часа, и, после декапитации, через сутки, 3 и 7 сут после острого воздействия. Материал фиксировали в 10% забуференном формалине и 2.5% глутаровом альдегиде. Для гистологического исследования образцы почек обезживали в спиртах восходящей концентрации, заливали в парафин. Полученные срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Для ультрамикроскопического исследования материал дополнительно фиксировали 2% раствором OsO₄, последовательно обезживали в спиртах и ацетоне восходящей концентрации, заливали в смолу Araldite (EMS, США). Двойное контрастирование ультратонких срезов осуществляли раствором цитрата свинца и 1% водным рас-

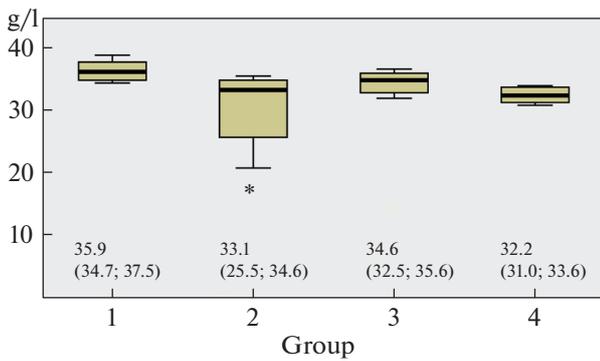


Рис. 1. Уровень содержания альбумина в сыворотке крови животных контрольной (1) и экспериментальной группы через сутки (2), 3 сут (3) и 7 сут (4) после воздействия ДНФФ. На рисунке представлены значения Me (Q1, Q3) для каждой группы. * $p \leq 0.05$.

твором уранилацетата. Исследование проводили на световом микроскопе Axio Imager A2 (Carl Zeiss, Германия) и электронном микроскопе Merlin (Carl Zeiss, Германия).

Морфометрию проводили в базовой программе для получения, обработки и анализа изображений AxioVision, версия 4.8.2 (Carl Zeiss, Германия). На полученных препаратах измеряли толщину гломерулярных базальных мембран.

Полученные данные анализировали в программах Microsoft Office Excel 2007 и SPSS Statistics 17.0. Статистическую значимость различий между группами определяли с использованием непараметрического H -критерия Краскела–Уоллиса. Данные представлены в виде медиан.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отличий в уровнях билирубина, общего белка и альбумина в моче между контрольной и экспериментальной группами не выявлено. Содержание амилазы, лактата, мочевой кислоты, общего билирубина, креатинина, триглицеридов, мочевины, общего белка, глюкозы и D-3-гидроксибутирата в сыворотке крови также не имело различий между группами. Отмечено снижение уровня альбумина в сыворотке крови через сутки после отравления ($p = 0.018$), однако уже через 3 сут его уровень восстанавливался до контрольных значений (рис. 1).

Значимых отличий в клиренсе креатинина на разных сроках после отравления не выявлено, отмечена лишь тенденция ($0.05 < p < 0.1$) к снижению клиренса через сутки и к увеличению до контрольных значений через 3 сут после воздействия ДНФФ.

В экспериментальной группе животных выявлено снижение суточного диуреза в первые сутки интоксикации ($p = 0.05$) (рис. 2a), при этом относительная плотность мочи увеличивается ($p = 0.001$), а показатели изменяются в кислую сторону через сутки и в щелочную через 3 сут ($p = 0.001$) (рис. 2b,c). Уровень мочевой кислоты в моче увеличивается через сутки и 3 сут по сравнению со значениями контрольной группы ($p = 0.013$) (рис. 2d), а уровень D-3-гидроксибутирата увеличен через сутки ($p = 0.004$) (рис. 2e); также был отмечен рост уровня глюкозы в моче животных через сутки после острого воздействия ($p = 0.007$) (рис. 2f).

В тканях почек животных, погибших в течение 1-го часа после введения ДНФФ, выявлены изме-

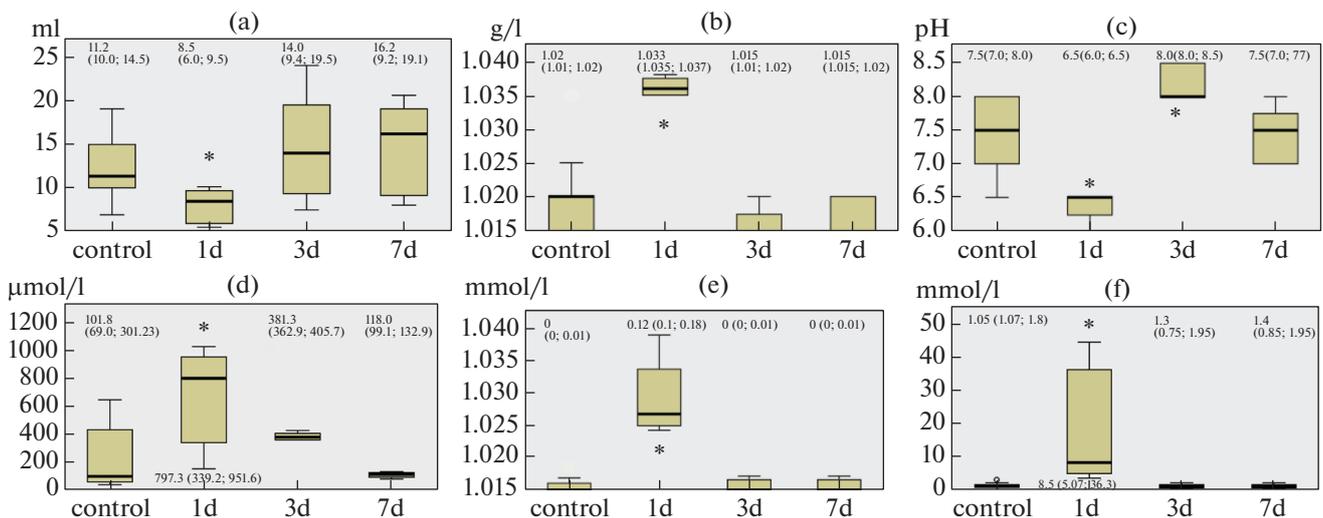


Рис. 2. Биохимические показатели мочи в контрольной группе и через сутки (1d), 3-е сут (3d) и 7 сут (7d) после острого воздействия ДНФФ. (a) Суточный диурез. (b) Относительная плотность мочи. (c) pH. (d) Уровень мочевой кислоты. (e) Уровень D-3-гидроксибутирата. (f) Уровень содержания глюкозы. На рисунке представлены значения Me (Q1, Q3) для каждой группы. * $p \leq 0.05$.

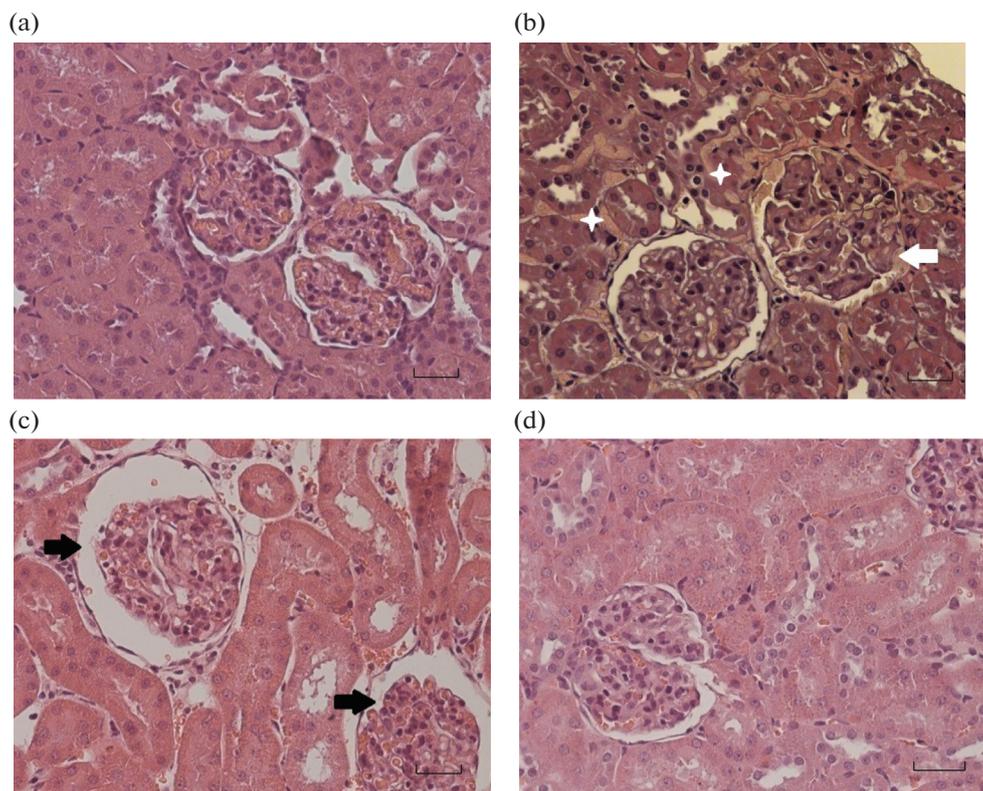


Рис. 3. Морфологические изменения в почках крыс контрольной группы (а), погибших в течение часа (б), через сутки (с) и 7 сут (д) после введения ДНФФ в дозе ЛД50. Кровоизлияния в интерстиций показаны звездами, кровоизлияния в капсулу клубочка (белая стрелка), растяжение капсулы Шумлянско-Боумена (черная стрелка). Окрашивание гематоксилином и эозином, масштабный отрезок = 50 мкм.

нения микроциркуляции, выражающиеся в появлении стазов в капиллярах интерстиция, клубочковых капиллярах и кровоизлияниях в капсулы клубочков (рис. 3b). Кровоизлияния в капсулу свидетельствуют о нарушении целостности фильтрационного барьера почек, что предположительно связано с разрывами гломерулярных базальных мембран. В структуре почечного тельца животных через сутки после отравления выявлены растяжение капсулы Шумлянско-Боумена и увеличение площади мочевого пространства при острой токсической нагрузке (рис. 3c). На ультраструктурном уровне выявлены очаговые нарушения люминальных поверхностей мембран эпителиальных клеток проксимальных извитых канальцев и обтурация просветов канальца десквамированными эпителиальными клетками. Через 7 сут после острого воздействия ДНФФ состояние паренхимы почек крыс соответствовало контролю (рис. 3d).

При ультраструктурном исследовании почек животных через 7 сут после отравления отмечали потерю четкого деления гломерулярных базальных мембран обработанных на lamina rara externa, lamina densa и lamina rara interna. Было выявлено статистически значимое увеличение толщи-

ны гломерулярных базальных мембран ($p = 0.05$) (рис. 3, 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Эпителиальные клетки, выстилающие проксимальные канальцы, играют важную роль в извлечении ионов и белков, проходящих сквозь гломерулярный фильтрационный барьер [21]. Протеинурии, как одного из основных критериев, свидетельствующих о нарушении функции почек, у животных, переживших острую интоксикацию ДНФФ, выявлено не было. Следовательно, нарушение целостности апикальной поверхности эпителиальных клеток, выявленное на ранних сроках, не оказывает влияние на апикальный эндоцитоз белков. Вероятно, мультилигандные рецепторы мегалин и кубилин, обеспечивающие реабсорбцию белков и располагающиеся между микроворсинками эпителиальных клеток проксимального извитого канальца, экспрессированы в достаточном количестве клеток для обеспечения нормального уровня реабсорбции [21, 22]. Это соответствует результатам других исследований, где, в случае применения низких доз ФОС, в первые сутки после отравления гистопатологических изменений в тка-

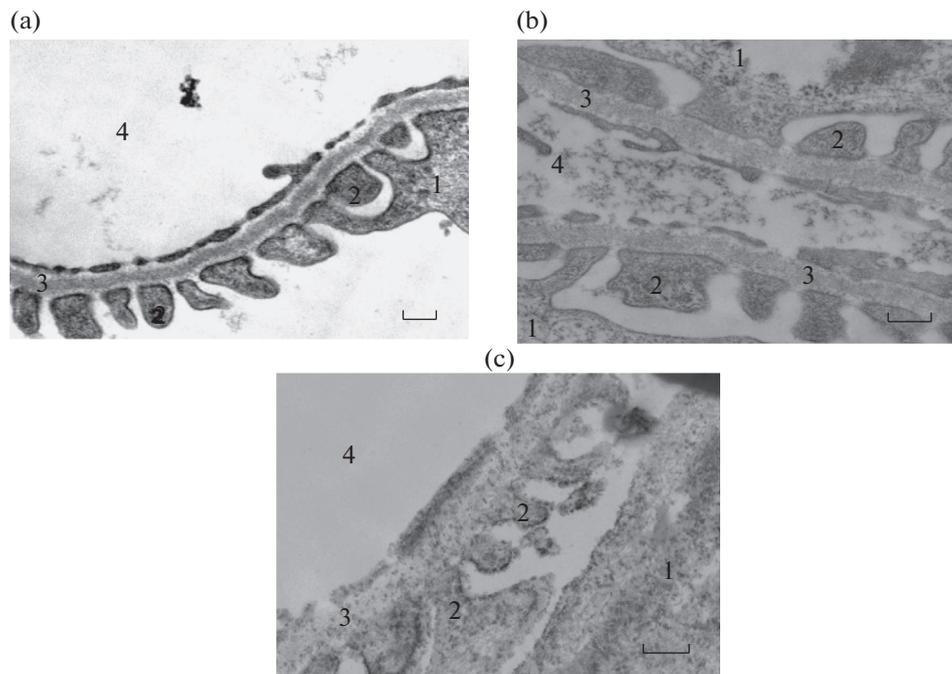


Рис. 4. Гломерулярные базальные мембраны фильтрационного барьера почек в контрольной группе (а), через сутки (b) и 7 сут (с) после введения ДНФФ в дозе ЛД50. 1 – тело подоцита, 2 – ножковые отростки подоцитов, 3 – гломерулярная базальная мембрана, 4 – просвет клубочкового капилляра. Трансмиссионная электронная микроскопия, масштабный отрезок = 200 nm.

нях почек животных не наблюдалось, хотя через 3 нед хронического воздействия они оказывались ярко выраженными и включали кровотечение, десквамацию эпителия канальцев, инфильтрацию воспалительными клетками и некроз [23]. Нормальный уровень реабсорбции белка в проксимальных канальцах косвенно указывает на целостность гломерулярных мембран фильтрационного барьера почек в ранние сроки у выживших животных после отравления сублетальными дозами ДНФФ и сохранность достаточного количества канальцев для его поддержания.

Выявленное снижение уровня альбумина в сыворотке крови через сутки после острого воздействия без увеличения его экскреции с мочой может свидетельствовать о нарушении гемато-тканевых барьеров и вероятном выходе альбумина в паренхиму головного и спинного мозга [24–26]. Следов выведения необратимо связанных комплексов альбумин-ФОС в фильтрационном барьере почек или моче в нашем исследовании обнаружено не было ни через сутки, ни через 7 суток после воздействия ДНФФ. Электронно-плотные комплексы в структуре гломерулярных мембран также не обнаружены. Однако наличие следов белка в толще гломерулярных мембран в исследованиях токсического действия ФОС на ткань почек показано для квиналфоса [27].

Согласно литературным данным, ключевыми факторами, способствующими повреждению проксимальных канальцев, являются гипергликемия, протеинурия, гипоксия и воспаление [28]. Нарушения микроциркуляции, выявленные в тканях почек крыс, погибших в течение часа после воздействия ДНФФ, указывают на формирование для клеток почек выживших животных гипоксических условий. Согласно современным представлениям вышеуказанные факторы оказывают свое воздействие через изменения сигналинга TGF-beta

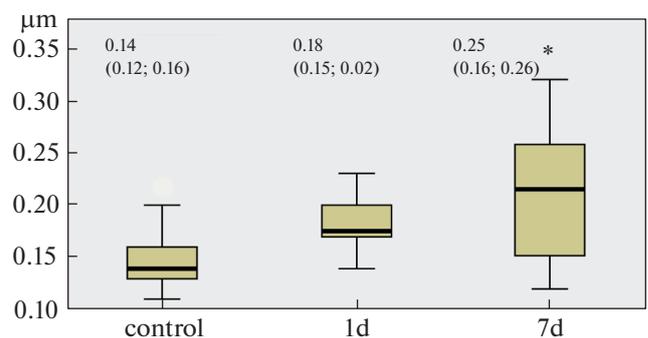


Рис. 5. Толщина гломерулярных базальных мембран фильтрационного барьера почек крыс через сутки (1d) и 7 сут (7d) после введения ДНФФ в дозе ЛД50. На рисунке представлены значения Me (Q1, Q3) для каждой группы. * $p \leq 0.05$.

и баланса медиаторов ренин-ангиотензиновой системы, дисрегуляцию полиолового и гексозаминового пути, активности протеинкиназы С, а также через образование конечных продуктов гликирования [28].

Согласно клиническим наблюдениям у пострадавших от воздействия ФОС наблюдается транзиторная глюкозурия при эугликемии [29]. В нашем исследовании у животных, переживших острую интоксикацию, наблюдалась аналогичная ситуация, высокий уровень содержания глюкозы в моче сочетался с отсутствием изменений уровня глюкозы в крови через сутки и 3 сут после воздействия. Как известно, апикальные мембраны эпителиальных клеток извитых канальцев несут на себе рецепторы к инсулину и транспортеры глюкозы [30, 31]. Потеря микроворсинок апикальной части клеток проксимальных канальцев приводит к утрате Независимых SGLT-переносчиков глюкозы, что нарушает активный транспорт глюкозы в клетку из просвета канальца [32]. Снижение количества рецепторов инсулина в проксимальных канальцах, которое имеет место при инсулинорезистентном состоянии, также способствует развитию гипергликемии за счет усиления глюконеогенеза [31]. Изменения клеточных функций, происходящие в ответ на воздействие различных эндогенных факторов, в том числе и отравления ФОС, вызывающие потерю инсулиновых рецепторов и SGLT-переносчиков глюкозы в поврежденных проксимальных канальцах, могут способствовать развитию диабетоподобной нефропатии [30]. Это подтверждается полученными данными, свидетельствующими о возникновении метаболического кетоацидоза через сутки после отравления: смещение рН мочи в кислую сторону, рост уровня мочевой кислоты и D-3-гидроксипутирата. D-3-гидроксипутират является наиболее распространенным кетоном, обеспечивающим индикацию кетоацидоза. Имеются данные о случаях интоксикации человека ФОС, проявляющихся как диабетический кетоацидоз [33–35]. В моделях на животных эти соединения влияют на пути метаболизма глюкозы, что в конечном итоге приводит к гипергликемии [34].

Рост уровня экскреции мочевой кислоты в моче обработанных животных в нашем исследовании согласуется с данными о последствиях повышенной активности ксантиноксидазы и повышенного уровня оксидативного стресса при отравлении [14, 36]. Мочевая кислота – конечный продукт метаболизма эндогенных и поступающих с пищей пуриновых соединений у человека, образующийся из ксантина под действием ксантиноксидазы. Выведение мочевой кислоты в просвет канальца происходит при помощи мочекислого или уратного переносчика 1 (URAT1), также экспрессированного на люминальной клеточной мембране и в цито-

плазме клеток проксимальных канальцев [37]. Частичная утрата эпителия проксимальных канальцев способна вызвать рост экскреции мочевой кислоты с мочой.

Патогистологические изменения в тканях почек при воздействии ДНФФ в дозе ЛД50 наиболее ярко проявляются через сутки, восстановление происходит в течение недели. Увеличение толщины гломерулярных базальных мембран, выявленное через 7 сут у обработанных животных не сочеталось с протеинурией и гематурией. Различий между контрольной и экспериментальной группами крыс по уровню сывороточной амилазы, которая, согласно данным некоторых исследований, имеет наибольшую диагностическую точность при оценке тяжести воздействия ФОС у человека [16], в нашем эксперименте не обнаружено.

В целом исследование показало, что однократное введение сублетальной дозы ДНФФ оказывает токсическое воздействие на крыс, отражающееся в ряде изменений биохимических показателей крови, мочи и морфологических показателей тканей почек. Согласно полученным данным, максимальные изменения биохимических показателей крови и мочи регистрируются через сутки после острого воздействия, выражаются в развитии метаболического кетоацидоза и снижении выделительной способности почек, что свидетельствует о формировании у крыс преморбидного состояния с последующей неполной его нормализацией. Результаты исследования позволяют предположить риск развития диабетической нефропатии в результате острой интоксикации ФОС.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках госзадания № 075-0152-22-00.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн исследования (В.Е.С., Н.В.Г.), сбор и обработка данных, статистический анализ, написание текста (М.О.С., В.Е.С.), редактирование манускрипта (В.Е.С., Н.В.Г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Solomon KR, Williams WM, Mackay D, Purdy J, Giddings JM, Giesy JP (2014) Properties and uses of chlorpyrifos in the United States. *Rev Environ Contam Toxicol* 231: 13–34. https://doi.org/10.1007/978-3-319-03865-0_2

2. *Leonel Javeres MN, Raza S, Judith N, Anwar F, Habib R, Batool S, Nurulain SM* (2020) Mixture of organophosphates chronic exposure and pancreatic dysregulations in two different population samples. *Front Public Health* 8: 534902.
<https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.534902>
3. *Farkhondeh T, Mehrpour O, Buhrmann C, Pourbagher-Shahri AM, Shakibaei M, Samarghandian S* (2020) Organophosphorus compounds and mapk signaling pathways. *Int J Mol Sci* 21: 42–58.
<https://doi.org/10.3390/ijms21124258>
4. *Goncharov NV, Nadeev AD, Jenkins RO, Avdonin PV* (2017) Markers and biomarkers of endothelium: when something is rotten in the state. *Oxidat Med Cel Longev* 2017: 9759735.
<https://doi.org/10.1155/2017/9759735>
5. *Sobolev VE, Jenkins RO, Goncharov NV* (2017) Sulfated glycosaminoglycans in bladder tissue and urine of rats after acute exposure to paraoxon and cyclophosphamide. *Exp Toxicol Pathol* 69 (6): 339–347.
<https://doi.org/10.1016/j.etp.2017.02.007>
6. *Ubaid Ur Rahman H, Asghar W, Nazir W, Sandhu MA, Ahmed A, Khalid N* (2021) A comprehensive review on chlorpyrifos toxicity with special reference to endocrine disruption: Evidence of mechanisms, exposures and mitigation strategies. *Sci Total Environ* 755 (Pt 2): 142649.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142649>
7. *Tsai YH, Lein PJ* (2021) Mechanisms of organophosphate neurotoxicity. *Curr Opin Toxicol* 26: 49–60.
<https://doi.org/10.1016/j.cotox.2021.04.002>
8. *Прозоровский ВБ, Скопичев ВГ* (2004) Дистантное действие в патогенезе отравлений фосфоорганическими соединениями. *Обзоры по клин фармакол и лек терапии* 3: 56–67. [*Prozorovskij VB, Skopichev VG* (2004) Distant action in the pathogenesis of poisoning with organospore compounds. *Obzory po klin farmakol i lek terapii* 3: 56–67. (In Russ)].
9. *Cavari Y, Landau D, Leibson T, Lazar I* (2013) Organophosphate poisoning-induced acute renal failure. *Pediatric Emergency Care* 29: 646–647.
<https://doi.org/10.1097/PEC.0b013e31828e9e45>
10. *Kaya Y, Bas O, Hanci H, Cankaya S, Nalbant I, Odaci E, Uydu HA, Aslan A* (2018) Acute renal involvement in organophosphate poisoning: histological and immunochemical investigations. *Ren Fail* 40: 410–415.
<https://doi.org/10.1080/0886022X.2018.1489289>
11. *Sobolev VE, Korf EA, Goncharov NV* (2019) The rat (*Rattus norvegicus*) as a model object for acute organophosphate poisoning. 5. morphofunctional alterations in kidneys. *J Evol Biochem Physiol* 55 (4): 302–312.
<https://doi.org/10.1134/S0022093019040069>
12. *Salehi M, Jafari M, Asgari A, Salimian M, Abbasnezhad M* (2016) Strain-related differences on response of liver and kidney antioxidant defense system in two rat strains following diazinon exposure. *Zahedan J Res Med Sci* 18: 5988.
<https://doi.org/10.17795/zjrms-5988>
13. *Chung YL, Hou YC, Wang IK, Lu KC, Yen TH* (2021) Organophosphate pesticides and new-onset diabetes mellitus: From molecular mechanisms to a possible therapeutic perspective. *World J Diabetes* 12 (11): 1818–1831. PMID:
<https://doi.org/10.4239/wjd.v12.i11.181834888010>
14. *Rambabu L, Megson IL, Eddleston M* (2020) Does oxidative stress contribute to toxicity in acute organophosphorus poisoning? - a systematic review of the evidence. *Clin Toxicol (Phila)* 58:437–452.
<https://doi.org/10.1080/15563650.2019.1693589>
15. *Nurulain SM, Ojha S, Tekes K, Shafiullan M, Kalasz H, Adem A* (2015) Efficacy of N-acetylcysteine, glutathione, and ascorbic acid in acute toxicity of paraoxon to wistar rats: survival study. *Oxidat Med Cell Longev* 2015: 329306.
<https://doi.org/10.1155/2015/329306>
16. *Sumathi ME, Kumar SH, Shashidhar KN, Takkala N* (2014) Prognostic significance of various biochemical parameters in acute organophosphorus poisoning. *Toxicol Int* 21: 167–171.
<https://doi.org/10.4103/0971-6580.139800>
17. *Паликов ВА, Терехов СС, Паликова ЮА, Хохлова ОН, Казаков ВА, Дьяченко ИА, Пантелеев СВ, Мокрушина ЮА, Кнорре ВД, Шамборант ОГ, Смирнов ИВ, Габиров АГ* (2018) Мышиная модель для оценки субхронической токсичности фосфорорганических пестицидов. *ACTA NATURAE* 10: 125–128. [*Palikov VA, Terekhov SS, Palikova YUA, Hohlova ON, Kazakov VA, D'yachenko IA, Panteleev SV, Mokrushina YuA, Knorre VD, Shamborant OG, Smirnov IV, Gabibov AG* (2018) Mouse Model for evaluation of subchronic toxicity of organophosphate pesticides. *ACTA NATURAE* 10: 125–128. (In Russ)].
18. *Goncharov NV, Terpilowski MA, Shmurak VI, Belinskaya DA, Avdonin PV* (2019) The rat (*Rattus norvegicus*) as a model object for acute organophosphate poisoning. 1. biochemical aspects. *J Evol Biochem Physiol* 55 (2): 112–123.
<https://doi.org/10.1134/S0022093019020042>
19. *Kuznetsov SV, Goncharov NV* (2019) The rat (*Rattus norvegicus*) as a model object for acute organophosphate poisoning. 3. Cardiorespiratory indices. *J Evol Biochem Physiol* 55 (3): 239–243.
<https://doi.org/10.1134/S0022093019030104>
20. *Sobolev VE, Shmurak VI, Goncharov NV* (2019) The rat (*Rattus norvegicus*) as a model object for acute organophosphate poisoning. 4. m1-cholinoreceptors and esterase activity in brain homogenates. *J Evol Biochem Physiol* 55 (3): 244–248.
<https://doi.org/10.1134/S0022093019030116>
21. *Eshbach ML, Weisz OA* (2017) Receptor-mediated endocytosis in the proximal tubule. *Annu Rev Physiol* 79: 425–448.
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034234>
22. *Christensen EI, Birn H, Storm T, Wever K, Nielsen R* (2012) Endocytic receptors in the renal proximal tubule. *Int Union Physiol Sci. Am Physiol Soc* 4: 223–236.
<https://doi.org/10.1152/physiol.00022.2012>

23. *Massoud A, Allah MS, Dahran NA, Nasr NE, El-Fkharany I, Ahmed MS, Alsharif KF, Elmahallawy EK, Derbalah A* (2022) Toxicological effects of malathion at low dose on wister male rats with respect to biochemical and histopathological alterations. *Front Environ Sci* 10: 860359. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.860359>
24. *Колесниченко ИП, Долго-Сабурова ИС, Сомова ТВ* (1992) Изменения биохимического состава цереброспинальной жидкости при остром отравлении карбофосом. *Ж невропатол психиатр им СС Корсакова* 92 (2): 95–99. [*Kolesnichenko IP, Dolgo-Saburova IS, Somova TV* (1992) Changes in the biochemical composition of cerebrospinal fluid in acute carbophos poisoning. *Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova*. 92 (2): 95–99. (In Russ)]
25. *Belinskaia DA, Voronina PA, Shmurak VI, Jenkins RO, Goncharov NV* (2021) Serum albumin in health and disease: esterase, antioxidant, transporting and signaling properties. *Int J Mol Sci* 22 (19): 10318. <https://doi.org/10.3390/ijms221910318>
26. *Belinskaia DA, Voronina PA, Goncharov NV* (2021) Integrative role of albumin: evolutionary, biochemical and pathophysiological aspects. *J Evol Biochem Physiol* 57 (6): 1419–1448. <https://doi.org/10.1134/S002209302106020X>
27. *Eid RA* (2017) Apoptosis of rat renal cells by organophosphate pesticide, quinalphos: ultrastructural study. *Saudi journal of kidney diseases and transplantation: an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation* 28: 725–736.
28. *Slyne J, Slattery C, McMorrow T, Ryan MP* (2015) New developments concerning the proximal tubule in diabetic nephropathy: in vitro models and mechanisms. *Nephrol Dial Transplant* 30: 60–67. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfv264>
29. *Chung YL, Hou YC, Wang IK, Lu KC, Yen TH* (2021) Organophosphate pesticides and new-onset diabetes mellitus: From molecular mechanisms to a possible therapeutic perspective. *World J Diabetes* 12 (11): 1818–1831. <https://doi.org/10.4239/wjd.v12.i11.1818>
30. *Lee YJ, Lee YJ, Han HJ* (2007) Regulatory mechanisms of Na⁺/glucose cotransporters in renal proximal tubule cells. *Kidney International*. 72: S27–S35. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002383>
31. *Tiwari S, Sing RS, Li L, Tsukerman S, Godbole M, Pandey G, Ecelbarger CM* (2013) Deletion of the insulin receptor in the proximal tubule promotes hyperglycemia. *J Am Soc Nephrol* 24: 1209–1214. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012060628>
32. *Mather A, Pollock C* (2011) Glucose handling by the kidney. *Kidney Int* 79 (Suppl 120): S1–S6. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.509>
33. *Akyildiz BN, Kondolot M, Kurtoglu S, Akin L* (2009) Organophosphate intoxication presenting as diabetic ketoacidosis. *Ann Trop Paediatr* 29: 155–158. <https://doi.org/10.1179/146532809X440789>
34. *Swaminathan K, Sundaram M, Prakash P, Subbiah S* (2013) Diabetic ketoacidosis: an uncommon manifestation of pesticide poisoning. *Diabetes Care* 36: e4. <https://doi.org/10.2337/dc12-1251>
35. *Badrane N, Askour M, Berechid K, Abidi K, Dendane T, Zeggwagh AA* (2014) Severe oral and intravenous insecticide mixture poisoning with diabetic ketoacidosis: a case report. *BMC Research Notes* 7: 485. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-485>
36. *Молчанова ОВ, Бритов АН, Платонова ЕВ* (2020) Значение повышенного уровня мочевой кислоты в развитии и профилактике хронических неинфекционных заболеваний. *Профилактич Мед* 23: 102–108. [*Molchanova OV, Britov AN, Platonova EV* (2020) Importance of elevated uric acid levels in the development and prevention of chronic non-communicable diseases. *Профилактическая Медицина*. 23: 102–108. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17116/profmed202023021102>
37. *Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, Shigeta Y, Jutabha P, Cha SH, Hosoyamada M, Takeda M, Sekine T, Igarashi, Matsuo H, Kikuchi Y, Oda T, Ichida K, Hosoya, Shimokata K, Niwa T, Kanai Y, Endou H* (2002) Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* 417: 447–452. <https://doi.org/10.1038/nature742>

Ultrastructural Changes in the Kidneys and Biochemical Parameters of Blood and Urine in Rats during Acute Intoxication with *O,O*-Diethyl-*O*-(4-Nitrophenyl)phosphate

M. O. Sokolova^{a,b,#}, V. E. Sobolev^a and , and N. V. Goncharov^a

^a *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

^b *S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia*

[#] *e-mail: sokolova.rita@gmail.com*

Pesticides based on organophosphorus compounds (OPs) are widely used in agriculture worldwide, which is fraught with acute and chronic human poisoning. In general, toxic effects of OPs on the mammals are well studied, but many details of the etiology of immediate and long-term consequences of poisoning require additional attention. The aim of this study was to assess the dynamics of biochemical blood and urine parameters along with pathomorphological and ultrastructural changes in the kidneys after acute poisoning of experimental rats with *O,O*-diethyl-*O*-(4-nitrophenyl)phosphate (ethyl-paraoxon, DNPP). The study was carried out on white outbred male rats *Rattus norvegicus* weighing 200–250 g. DNPP was administered to experimental groups animals at a lethal dose 50 (LD50, single injection). Blood serum and urine samples for biochemical analysis and kidney

tissue samples for morphological investigation were taken on days 1, 3 and 7 after poisoning. Daily diuresis and urine specific gravity, as well as serum and urine levels of bilirubin, total protein, glucose, pH, creatinine, albumin, D-3-hydroxybutyrate and uric acid, were assessed. Pathomorphological changes in kidney tissue were described. After DNPP exposure, there were observed a decrease in albumin and an increase in uric acid, glucose and D-3-hydroxybutyrate levels, as well as a decrease in the volume of daily diuresis and urine pH, paralleled by an increase in urine specific gravity. Morphological analysis of kidney tissue revealed a damage to epithelial cells of the proximal convoluted tubules and an increase in the thickness of glomerular basement membranes, respectively, 24 h and 7 days after DNPP exposure. A single sublethal dose of DNPP had a nephrotoxic effect, as manifested in changes in biochemical blood and urine parameters, as well as morphological parameters of kidney tissue. The most pronounced changes in biochemical parameters were recorded one day after DNPP exposure, indicative of a decrease in the excretory capacity of the kidneys and the development of metabolic ketoacidosis. The thickening of glomerular basal membranes in 7 days after exposure suggests the prerequisites for the formation of delayed pathology.

Key words: organophosphates, rats, biochemistry, nephrotoxicity, glomerular basal membrane, electron microscopy, convoluted tubules, nephropathy