

УДК 616.611:636.93

УЛЬТРАСТРУКТУРА И НАНОМОРФОЛОГИЯ ПОЧЕК НОРКИ АМЕРИКАНСКОЙ

В. О. Ежков¹, М. С. Ежкова², И. А. Яппаров¹, А. Х. Яппаров¹,
И. Р. Низамеев², Е. С. Нефедьев², А. М. Ежкова^{1,*}, Ю. В. Ларина¹

Представлено академиком РАН А.Я. Самуйленко 01.08.2018 г.

Поступило 24.12.2018 г.

Исследовали ультраструктуру субклеточных органелл клеток нефронов почек здоровых норок. Полученные данные сравнили с результатами трансмиссивной электронной микроскопии. Обнаружили сходство наноморфологии клеток почек при анализе электронограмм и изображений, полученных с помощью атомно-силовой микроскопии. Используемые методы позволили визуализировать эндотелициты капилляров гломерулы с углублениями цитолеммы в области фенестр, обеспечивающих фильтрацию крови, а в эпителиальной клетке проксимального отдела нефрона в области апикального полюса — мягкие структуры микроворсинок щёточной каёмки. На всём протяжении длины микроворсинок установили организованность их структуры и целостность мембраны. Полученные данные могут быть использованы для определения морфологических параметров здорового органа норки и при сравнительной диагностике нефропатологии.

Ключевые слова: почка, ультраструктура, наноморфология, гломерулярный фильтр, нефрон, норка американская.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524855642-645>

Почка — парный орган, выполняющий посредством функции мочеобразования регуляцию химического гомеостаза организма. Входит в мочевыделительную систему позвоночных животных, в том числе и человека. Выделяют следующие функции почек: экскреторную, гомеостатическую, метаболическую, инкреторную и защитную. Основной функцией почек, обеспечивающей ведущую роль в выделительной системе организма, является образование и выделение мочи. Структурно-функциональной единицей почки является нефрон, состоящий из гломерулы капилляров, его капсулы (почечное тельце) и системы канальцев [1].

Для объективизации знаний по морфологии как в норме при изучении онтогенеза, так и при патологии с целью уточнения клинического диагноза необходимо проведение качественного и количественного светооптического, электронно-микроскопического и наноморфологического анализа биопсийного и аутопсийного материалов. Активное внедрение нанотехнологий в различные области биологии и ветеринарной медицины сделали воз-

можным изучение фундаментальных основ структуры органов и тканей животных на наноразмерном уровне. Основным инструментом, позволяющим проводить подобные исследования, является сканирующий зондовый микроскоп [2].

Для выявления структурно-функционального состояния почек важную роль имеют результаты изучения ультраструктуры и наноморфологии органов, о которых в научной литературе имеются единичные сообщения с противоречивой интерпретацией данных в работах разных авторов. Поэтому проведение исследований с применением современных методов и аппаратуры позволят уточнить ряд вопросов фундаментальной морфологии и расширить сведения о разных уровнях организации живой материи.

Цель настоящей работы — исследовать ультраструктуру и наноморфологию клеток почек на модели органов клинически здоровых норок с применением методов трансмиссивной электронной и атомно-силовой микроскопии. При этом мы решали следующие задачи: изучали структурно-функциональное состояние гломерулярного фильтра и эпителиальных клеток проксимального отдела нефронов.

Материалом для исследований стали почки клинически здорового молодняка норки семимесячного

¹ Татарский научно-исследовательский институт агрохимии и почвоведения Казанского научного центра Российской Академии наук

² Казанский национальный исследовательский технологический университет

*E-mail: egkova-am@mail.ru; niiaxp2@mail.ru

возраста, выращенных в условиях звероводческой фермы ООО Агрофирма “Берсутский” (Россия). Органы 36 норок извлекали в период технологического убоя пушных зверей, который выполняли согласно Международным рекомендациям (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных [3].

При исследовании ультраструктуры органов методом трансмиссивной электронной микроскопии пластинки почек размером $0,1 \times 0,1 \times 0,1$ см помещали в очищенный 2,5%-й раствор глутаральдегида, разрезали на кусочки величиной $0,1 \text{ мм}^3$ и фиксировали в течение 4–6 ч. Далее кусочки почек отмывали осмиевым фиксатором в течение 2 ч при температуре 4°C и заливали араалдитом и эпоном. С помощью ультратома LKB-III (“LKB”, Швеция) получали срезы, которые контрастировали 2%-м спиртовым раствором уранилацетата в течение 15 мин и цитратом свинца по Рейнольдсу. Препараты просматривали в электронном микроскопе JEM-100CX (“JEOL Ltd.”, Япония) при ускоряющем напряжении 75 кВ. Поиск и идентификацию необходимых участков органа проводили методом прицельного изготовления ультратонких срезов.

Для исследования наноморфологии почек методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) кусочки органов размером $0,1 \times 0,1 \times 0,5$ см фиксировали в 10%-м водном растворе нейтрального формалина в отношении 9 : 1 при температурном режиме 4°C в течение недели. Далее материал 30 мин промывали проточной водой. Препараты почек фиксировали на металлической подложке, измерения проводили с помощью сканирующего зондового микроскопа MultiMode V производства фирмы “VEECO” (США) в режиме прерывисто-контактной атомно-силовой микроскопии. Для сканирования использовали прямоугольные кантилеверы RTESP (“VEECO”) с силиконовыми зондами. Резонансная частота кантилеверов была 250–350 кГц, радиус кривизны зонда составлял 10–13 нм. Препараты анализировали при скорости сканирования 1 Гц и разрешении изображения 512×512 точек.

Для исследований ультраструктуры мы отобрали наиболее характерные участки почек с повторяющимся микрорельефом. Гломерулярный фильтр почечных телец характеризовался наличием контактов мезангиальных клеток гладкомышечного (рис. 1) и мононуклеарного типов с базальной мембраной капилляров гломерулы. При этом происходили фильтрация крови и образование первичной мочи с выделением её в капсулу нефронов. Электронно-микроскопически в эпителиоцитах извитых

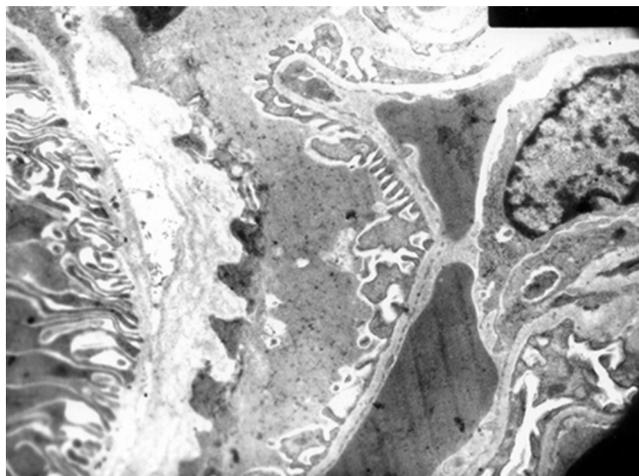


Рис. 1. Ультраструктура мезангиоцита гладкомышечного типа в гломеруле интеркортикального почечного тельца, контактирующего с базальной мембраной капилляра; $\times 8000$.

канальцев проксимального отдела нефрона отмечали хорошо сформированный базальный лабиринт, множество сигарообразных митохондрий между его мембранами (рис. 2). Эпителий проксимальных канальцев нефронов имел хорошо сформированные микроворсинки щёточной каёмки (ЩК) на апикальном полюсе. Базальные полюса эпителиальных клеток проксимальных канальцев почки контактировали с полнокровными кровеносными сосудами.

Атомно-силовая микроскопия даёт широкую возможность для изучения топографии и морфологии живых клеток, контактов между ними и субклеточных структур на атомарном уровне [4–7].

На АСМ-изображении эндотелиоциты гломерул капилляров почечного тельца характеризовались

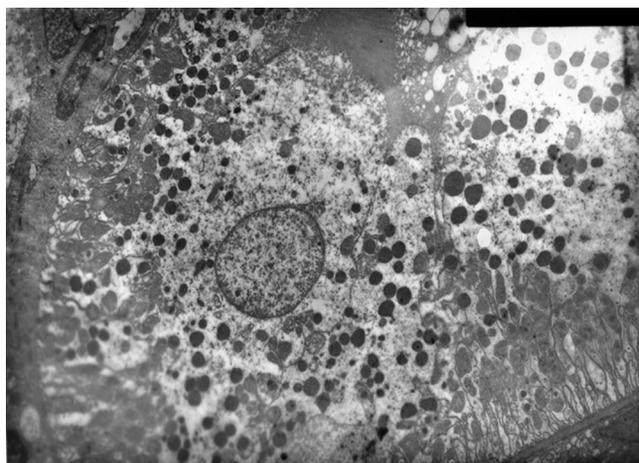


Рис. 2. Ультраструктура эпителиоцита извитого канальца проксимального отдела нефрона с выраженным базальным лабиринтом и множеством сигарообразных митохондрий между его мембранами; $\times 5000$.

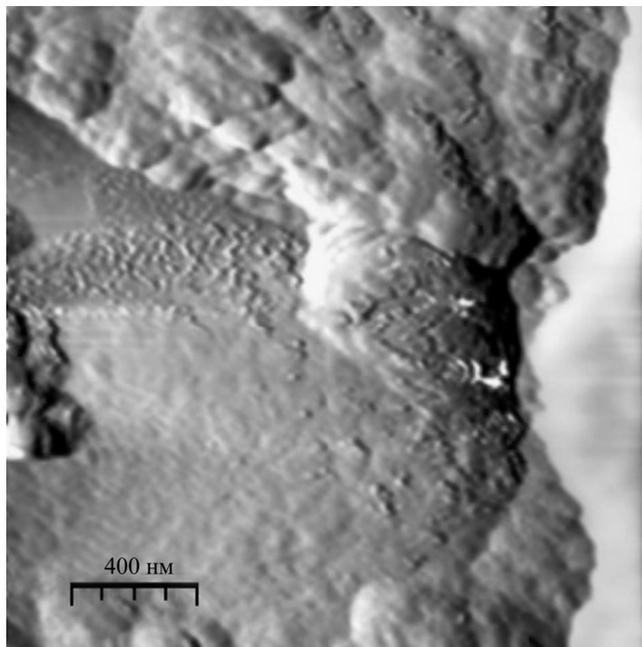


Рис. 3. АСМ-изображение топографии эндотелиоцита капилляра гломерулы с углублениями цитолеммы в области фенестры.

углублениями цитолеммы, свойственными фенестрам этих клеток для обеспечения фильтрации крови (рис. 3). Мы визуализировали мягкие структуры микроворсинок ЩК в области апикального полюса эпителиальной клетки проксимального отдела нефрона. На АСМ-изображении видна хорошо структурированная ЩК без нарушений поверхности мембраны микроворсинки на всей её протяжённости, включая область окончания (рис. 4).

Таким образом, мы с помощью электронной микроскопии исследовали ультраструктуру и проанализировали наноморфологические АСМ-изображения некоторых субклеточных структур нефронов почек клинически здоровых норок. Сравнительный анализ данных, полученных с помощью этих двух методов, позволил установить соответствие АСМ-изображений электронограммам. Метод визуализации почек с помощью АСМ менее трудоёмкий и достаточно информативный для объективизации строения органа. Данные об особенностях наноморфологии почки норок могут быть использованы для определения морфологических параметров здорового органа. С практической точки зрения АСМ-визуализация наноморфологии почек позволит провести сравнительные исследования для выявления пато-

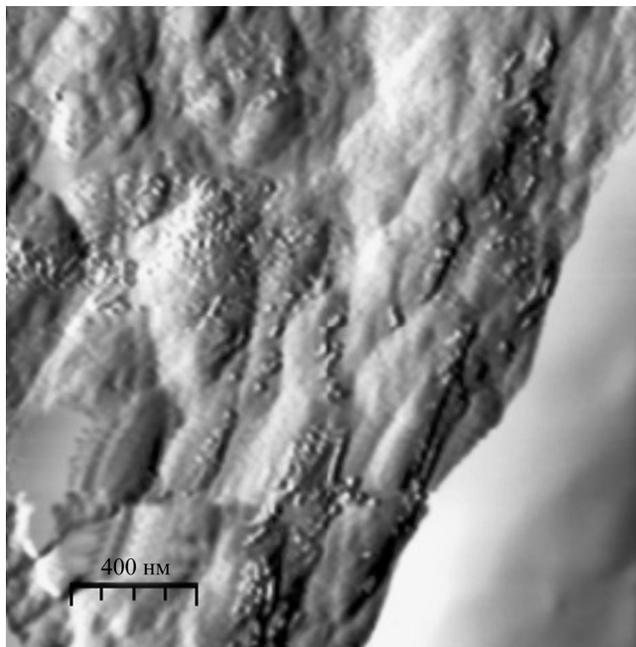


Рис. 4. АСМ-изображение топографии ворсинок щёточной каёмки эпителиоцита проксимального канальца нефрона почки.

логических процессов при ранней диагностике нефропатологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Физиология человека / Под ред. В.М. Покровского, Г.Ф. Коротько. М.: Медицина, 2003.
2. Павлович Е.Р. Проблемы изучения морфологии человека // Фунд. исслед. 2008. № 6. С. 107–108.
3. URL: www.msu.ru/bioetika/doc/recom.doc
4. Ежков В.О., Ежкова А.М., Янпаров А.Х., Янпаров И.А., Низамеев И.Р., Нефедьев Е.С. Опыт применения атомно-силовой микроскопии в морфологических исследованиях печени на примере норки американской // Рос. нанотехнологии. 2017. Т. 12. № 7/8. С. 107–113.
5. Schillers H., Medalsy I., Hu S., et al. PeakForce Tapping Resolves Individual Microvilli on Living Cells // J. Mol. Recogn. 2016. V. 29. № 2. P. 95–101.
6. Chiou Y.W., Lin H.K., Tang M.J., et al. The Influence of Physical and Physiological Cues on Atomic Force Microscopy-Based Cell Stiffness Assessment // PLoS One. 2013. V. 8. № 10. e77384.
7. Wyss H.M., Henderson J.M., Byfield F.J., et al. Biophysical Properties of Normal and Diseased Renal Glomeruli // Amer. J. Physiol. Cell Physiol. 2011. V. 300. № 3. P. 397–405.

**ULTRASTRUCTURE AND NANOMORPHOLOGY
OF THE AMERICAN MINK (MUSTELA VISON) KIDNEY****V. O. Ezhkov¹, M. S. Ezhkova², I. A. Yapparov¹, A. Kh. Yapparov¹,
I. R. Nizameev², E. S. Nefediev², A. M. Ezhkova¹, Ju. V. Larina¹**¹ *Federal Research Center "Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences",
Kazan', Republic of Tatarstan, Russian Federation*² *Kazan National Research Technological University, Kazan', Republic of Tatarstan, Russian Federation*

Presented by Academician of the RAS A.Ya. Samuylenko August 1, 2018

Received December 24, 2018

The ultrastructure of the nephron subcellular organelles was studied in healthy mink kidneys. The data obtained were compared with the results of transmission electron microscopy. The renal cell nanomorphology proved to be similar when electronograms and the atomic force microscopy images were analyzed. The methods used enabled us to visualize the glomerular capillary endotheliocytes with cytolemma pits in the area of fenestrae that provide blood filtration; in the proximal nephron part, on the apical pole of the epithelial cells, brush-border soft microvilli were observed. The microvilli were characterized by a well-organized structure along their entire length and the membrane integrity. The data obtained show morphological parameters of the healthy mink organ and can be helpful in diagnosing of nephropathology.

Keywords: kidney, ultrastructure, nanomorphology, the filter is the glomerulus, a nephron, the American mink.