

УДК 616. 611-002-092. 9

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ОСТРЫЙ ПОСТСТРЕПТОКОККОВЫЙ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТ

Н. Ю. Коломеец, Н. И. Аверьянова,
Н. Ю. Зарницына, П. В. Косарева

ГОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия
им. ак. Е. А. Вагнера», г. Пермь, pr_averyanova@rambler.ru

Целью работы явилось создание модели острого постстрептококкового гломерулонефрита путем иммунизации белых беспородных (нелинейных) крыс бактериальной суспензией эталонного штамма *Streptococcus pyogenes* в концентрации 10⁹ КОЕ/мл, в разведении 1:9. Эксперимент выполнен на 26 животных, содержащихся в стандартных условиях вивария. Иммунизацию проводили внутривентрально 1 раз в день по следующей схеме: 3 цикла, каждый из которых состоял из 1, 3, 5 дней иммунизации и 2 дней перерыва между циклами. При последующем гистологическом исследовании препаратов почек иммунизированных животных наблюдалась морфологическая картина, соответствующая патоморфологическим изменениям, характерным для острого гломерулонефрита. Воспроизводимость эксперимента составила 100%.

Ключевые слова: экспериментальная модель, острый постстрептококковый гломерулонефрит, белые беспородные (нелинейные) крысы.

EXPERIMENTAL ACUTE POSTSTREPTOCOCCAL GLOMERULONEPHRITIS

N. Yu. Kolomeets, N. I. Averyanova, N. Yu. Zarnitsina, P. V. Kosareva

Perm State Academy of Medicine named after Academician E. A. Wagner, Russia
pr_averyanova@rambler.ru

The aim of work was to create the model of acute poststreptococcal glomerulonephritis by means of immunization of white outbred (nonlinear) rats with bacterial suspension of *Streptococcus pyogenes* reference strain in the concentration of 10⁹ КОЕ/ml, diluted 1:9. The experiment was performed on 26 animals kept in standard conditions of vivarium. Immunization was carried out intraperitoneally once a day by the following scheme: 3 cycles, each consisting of 1, 3, 5 immunization days with two-day intervals between the cycles. Subsequent histological investigation of renal preparations of immunized animals demonstrated morphological picture corresponding to pathomorphological changes, typical for acute glomerulonephritis. Reproducibility of experiment was 100%.

Keywords: experimental model, acute poststreptococcal glomerulonephritis, white outbred (nonlinear) rats.

Острый гломерулонефрит — тяжелое поражение структуры почечных клубочков, развивающееся вследствие перенесенной стрептококковой инфекции, вызванной в основном, штаммами М серотипов 1, 2, 4, 12, 18, 25, 49, 55, 57, 60 и некоторых других М-типов стрептококка группы А. Общепринятым является мнение об остроте процесса, однако заболевание может иметь хроническое течение, нередко приводить к дисфункции почек (альбинурия и снижение скорости клубочковой фильтрации могут сохраняться у перенесших острый гломерулонефрит пожизненно), что позволяет рассматривать его в ряду причинных факторов хронической болезни почек [4]. В настоящее время диагноз острый постстрептококковый гломерулонефрит реже ставится в специализированных нефрологических отделениях, хотя по-прежнему наблюдаются и спорадические случаи, и эпидемические вспышки данного заболевания [2,6,7].

Накопленный клинический и экспериментальный опыт позволяет проследить основные моменты в патогенезе заболевания, которые сводятся к активности «нефритогенных» продуктов, нарастанию титров антител к ряду экстрацеллюлярных продуктов и ферментов стрептококка, снижению уровня комплемента, дисбалансу содержания иммуноглобулинов и повреждающему действию циркулирующих специфических иммунных комплексов [3,5]. Существенный вклад в патогенетическое обоснование острого постстрептококкового повреждения гломерулярных структур внесли работы по созданию экспериментальных моделей на мышах и кроликах. При использова-

нии мышей в качестве экспериментальных животных воспроизведение заболевания осуществлялось посредством инокуляции живой культуры стрептококка и создания локального очага инфекции, откуда экстрацеллюлярные продукты распределялись по организму хозяина. В модели на кроликах использовалась многократно вводимая парентерально и убитая прогреванием культура *Streptococcus pyogenes*, сохранившая поверхностно локализованные факторы патогенности микроба и подвергающаяся генерализации в его организме [1].

Создание экспериментальных моделей острого гломерулонефрита необходимо не только для дальнейшего изучения механизмов пато- и морфогенеза заболевания, но и для доклинической апробации новых лекарственных препаратов, предлагаемых фармацевтической промышленностью и обладающих нефропротективным действием.

Материалы и методы исследования:

Эксперимент выполнен на 26 животных — самцах и самках беспородных белых крыс четырехмесячного возраста, содержащихся в стандартных условиях вивария. Все эксперименты проведены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. N 755) и «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18 марта 1986 г.

Животные были разделены на 2 экспериментальные группы: I группа — контрольная (интактные животные), n=10; II группа (опытная) — животные, иммунизирован-

ные бактериальной суспензией эталонного штамма *Streptococcus pyogenes* (ГНИИ стандартизации и контроля им. Л. А. Тарасевича), $n=16$. С целью подтверждения воспроизводимости эксперимента II группа была подразделена на 2 подгруппы, различающиеся сроком забора мочи для лабораторного исследования и органов для аутопсии и гистологического анализа (21 и 31 день иммунизации).

Антигенную суспензию для иммунизации животных получали путем культивирования штамма на мясоептонном бульоне в аэробных условиях при температуре $+37^{\circ}\text{C}$, последующем центрифугировании суточной бульонной культуры *Streptococcus pyogenes* в течение 10-15 минут при скорости 3000 оборотов в минуту и последующем удалении супернатанта. Полученную взвесь концентрацией 109 КОЕ/мл, определяемой на КФК-3 (оптическая плотность 0,028, длина волны 540 нм, кювета — 1,060 мм), инактивировали при $+56^{\circ}\text{C}$ в течение 30 минут. Из расчета 50 мкл взвеси на 1 животное готовили разведение: 9 мл стерильного физиологического раствора и 1 мл взвеси (на 1 животное приходится 500 мкл (0,5 мл) полученной вновь взвеси антигенной суспензии). Иммунизацию животных проводили внутрибрюшинно 1 раз в день по схеме: 3 цикла, каждый из которых состоял из 1, 3, 5 дней иммунизации и 2 дней перерыва между циклами.

Перед началом эксперимента у животных контрольной (интактной) и опытной группы проводили микроскопию мочевого осадка и анализ разовой порции мочи на белок, используя качественную реакцию с 20%-ной сульфосалициловой кислотой. В конце

каждого цикла иммунизации у животных контрольной и опытной групп также исследовали разовую порцию мочи на белок и проводили микроскопию осадка. По окончании опыта животных выводили из эксперимента путем перерезки спинного мозга под эфирным наркозом с соблюдением правил эвтаназии. Внутренние органы забирали для проведения аутопсии и гистологического исследования, почки животных фиксировали в 10%-ной нейтральной формалине, подвергали обезвоживанию в спиртах возрастающей крепости, заливали в парафин. Срезы получали на ротационном микротоме (толщина 3-4 мкм), окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по ван Гизону, нитратом серебра по Футу. Микроскопию препаратов в проходящем свете проводили с использованием светового микроскопа Micros (Австрия) при увеличении микроскопа $\times 60$, $\times 150$, $\times 600$, $\times 1500$; захват гистологических объектов осуществляли при помощи цифровой камеры для микроскопа CAM V200 Micros «Handelsgesellschaft m. b. H.» (Австрия).

Результаты исследования

У животных контрольной группы не было выявлено лабораторных и гистологических признаков развития острого гломерулонефрита. В течение всего эксперимента в моче животных этой группы белок не выявлялся, в микроскопии мочевого осадка патологии не обнаружено.

При проведении аутопсии почки животных контрольной группы имели бобовидную форму, капсула легко снималась, обнажая блестящую, гладкую поверхность светло-коричневого цвета. На разрезе корковое вещество почек было светло-коричневого

цвета, мозговое вещество — темно-красное. Лоханка не расширена, ее слизистая оболочка блестящая, гладкая. При проведении гистологического исследования строение ткани почек соответствовало нормальному: четко выявлялась капсула, корковое вещество с почечными тельцами и извитыми канальцами, мозговое вещество, визуализировались сосочки и почечная лоханка, выстланная переходным эпителием. Сосудистые клубочки нефрона не изменены. Проксимальные и дистальные почечные канальцы с типичной структурой.

У иммунизированных животных II группы к 21 дню иммунизации визуально отмечалось снижение аппетита и двигательной активности. У 90% животных при проведении микроскопии мочевого осадка выявили гематурию — от незначительной до средней степени выраженности, исследование мочи на содержание белка показало положительный результат у 80% животных.

На секции отмечались макроскопические признаки застойной сердечной недостаточности: общее венозное полнокровие; увеличение печени (печень плотная, темная); инъектированность сосудов брюжейки, имелись небольшие кровоизлияния.

С целью подтверждения воспроизводимости модели острого гломерулонефрита забор материала у 8 животных II группы осуществляли на 21 день эксперимента. При проведении аутопсии почки иммунизированных животных имели бобовидную форму, были увеличены в размерах, выглядели набухшими. На разрезе корковое вещество имело серовато-коричневый цвет, мозговое вещество — вишнево-красный; лоханка не изменена. При проведении микроскопии

гистологических препаратов в ткани почек выявлялось полнокровие сосудов коркового и мозгового вещества, в корковом веществе визуализировалось большое количество увеличенных гиперцеллюлярных клубочков с резко уменьшенным мочевым пространством, инфильтрированных нейтрофильными гранулоцитами, эозинофилами и лимфоцитами, с аккумуляцией большого числа моноцитов в просветах капилляров. Выявленные изменения характеризовали в этом сроке экссудативную фазу воспаления и были выражены не менее чем в 60% клубочков, выявляемых в гистологическом срезе. Отмечалось сужение просветов капилляров клубочков вследствие пролиферации эндотелиальных и мезангиальных клеток, появление клубочков с лобулярной структурой. В проксимальных и дистальных канальцах нефронов изменения канальцевого эпителия были выражены умеренно (выявлялись участки белковой дистрофии эпителия, в интерстициальной ткани почек — участки воспалительной инфильтрации лимфоцитами, нейтрофилами и макрофагами) и имели очаговый характер.

У всех животных II группы к 31 дню иммунизации при свободном доступе к пище и воде отмечалось значительное снижение аппетита и потребности в жидкости, а также резкое снижение суточного диуреза по сравнению с контрольной группой. При проведении микроскопии мочевого осадка выявляли гематурию средней степени выраженности, содержание белка показало положительный результат у 100% животных.

При проведении аутопсии у 8 иммунизированных животных II группы на 31 день эксперимента макроскопически имелись

признаки отёка почечной ткани, изменения в лоханках отсутствовали. Гистологическое исследование ткани почек животных этой группы выявило в большинстве клубочков (80%) преобладание процессов пролиферации, что выражалось в появлении, наряду с мезангиальной и эндотелиальной пролиферацией, отложений нитей фибрина и белковых масс в капсуле Шумлянско-Боумана, сращении капилляров клубочка с капсулой и образовании полулуний в отдельных клубочках. Отмечался также тромбоз капилляров почечных телец. Гломерулярная базальная мембрана визуально выглядела значительно утолщенной. В проксимальных и дистальных извитых канальцах находили белковую дистрофию эпителия, в межпочечной ткани почек — воспалительную инфильтрацию нейтрофильными гранулоцитами и лимфоцитами.

Таким образом, в гистологических препаратах почек иммунизированных животных наблюдалась морфологическая картина, соответствующая патоморфологическим изменениям, характерным для острого гломерулонефрита. Воспроизводимость эксперимента составила 100%.

Список литературы

1. Бурова Л.А. Способность стрептококков группы А типа М12 связывать иммунные комплексы и их роль в патогенезе постстрептококкового гломерулонефрита/Л.А. Бурова, Е.А. Гаврилова. П.В. Пигаревский, В.Г. Селиверстова, В.А. Нагорнев, К. Шален, Артем А. Тотолян // Медицинская

иммунология. — 2006. — Т. 8, №5-6. — С. 623–630.

2. Acute post-streptococcal glomerulonephritis in children of French Polynesia: a 3-year retrospective study/O. Becquet, J. Pasche, H. Gatti, C. Chenel, M. Abély, P. Morville, C. Pietrement// *Pediatr. Nephrol.* — 2010. — Vol. 25, №2. — P. 275-280.

3. Cunningham, M. W. Pathogenesis of group A streptococcal infections/M. W. Cunningham// *Clin. Microbiol. Rev.* — 2000. — Vol. 13. — P. 470-511.

4. Acute postinfectious crescentic glomerulonephritis: clinicopathologic presentation and risk factors/A. A. El-Husseini, H. A. Sheashaa, A. A. Sabry, F. E. Moustafa, M. A. Sobh// *Int. Urol. Nephrol.* — 2005. Vol. 37, №3. — P. 603-609.

5. Garnier, A. Postinfectious acute glomerulonephritis/A. Garnier, M. Peuchmaur, G. Deschênes// *Nephrol Ther.* — 2009. Vol. 5, №2. — P. 97-101.

6. Jankauskiene, A. Postinfectious glomerulonephritis in children in Lithuania during 1995-2004: prevalence and clinical features/A. Jankauskiene, B. Pundziene, R. Vitkevicius// *Medicina (Kaunas).* — 2007. Vol. 43, №1. — P. 16-22.

7. Wong, W. Outcome of severe acute post-streptococcal glomerulonephritis in New Zealand children/W. Wong, M. C. Morris, J. Zwi// *Pediatr. Nephrol.* — 2009. Vol. 24, №5. — P. 1021-26.