

## РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ХРОНИЧЕСКОГО ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТА У БЕЛЫХ НЕЛИНЕЙНЫХ КРЫС

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

*ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. ак. Е.А. Вагнера Минздравсоцразвития России», Пермь, Россия (614990, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26), e-mail: rector@psma.ru*

Целью работы явилось создание модели хронического гломерулонефрита путем иммунизации белых беспородных (нелинейных) крыс I поколения суспензией почечного антигена, полученной от материнской особи. Эксперимент выполнен на 17 животных, самцах и самках белых крыс четырехмесячного возраста, массой  $170 \pm 59,2$  г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Иммунизацию проводили по запатентованной методике. Оценивали объективный статус животных, выделительную функцию почек по количеству мочеиспусканий за сутки, определяли наличие белка в разовой порции мочи, биохимические показатели крови, проводили гистологический и морфометрический анализ почечных структур. Предложенная модификация модели нефрита Heymann позволила с высокой степенью достоверности подтвердить успешное воспроизведение экспериментального хронического гломерулонефрита. Разработанная модель рекомендована к использованию в дальнейших доклинических исследованиях.

Ключевые слова: экспериментальная модель, хронический гломерулонефрит, белые нелинейные крысы.

## DEVELOPMENT OF CHRONIC GLOMERULONEPHRITIS MODEL IN ALBINO NONLINEAR RATS

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

*Perm State Academy of Medicine named after Academician E.A. Wagner, Russia (614990, Perm, 26 Petropavlovskaya St.,) e-mail: rector@psma.ru*

The aim of the work was to create a model of chronic glomerulonephritis by means of a suspension of kidney antigen (derived from the parent individual) immunization of albino (nonlinear) I generation rat. The experiment was performed on 17 animals, four-month old male and female albino rats,  $170 \pm 59,2$  g weighing, which were held in the standard vivarium conditions. Immunization was conducted using a patented method. The objective status of animals and kidneys excretory function by the number of urinations per day were evaluated, the presence of protein in a spot urine and biochemical factors of blood were determined, histological and morphometric analysis of kidney structures was conducted. The proposed modification of the Heymann nephritis model allowed us to confirm the successful reproduction of an experimental chronic glomerulonephritis with a high degree of confidence. The developed model is advised for further preclinical studies.

Key words: experimental model, chronic glomerulonephritis, albino nonlinear rats.

### Ведение

Нефрология представляет ту область медицины, в которой клиническая практика и физиологический эксперимент связаны самым непосредственным образом. Существенный успех достигнут в области воспроизведения разнообразных моделей, отражающих особенности патоморфологии, патогенеза различных вариантов заболевания, тактики доклинических лечебных и реабилитационных мероприятий [1–4]. Несмотря на многочисленные экспериментальные исследования, данные о роли различных повреждающих факторов в генезе гломерулопатий, механизмах и стратификации факторов риска прогрессирования, эффективности новых нефропротективных препаратов нельзя считать исчерпывающими.

В экспериментальной нефрологии российскими и зарубежными исследователями чаще всего используется модель активного и пассивного нефрита Неуманна и ее различные модификации. Активный нефрит Неуманна воспроизводится путем введения животному антигена, полученного из эпителия щеточной каймы проксимальных канальцев почек другого животного [4; 5]. Введением антимагалиновых JgG в качестве целевого антигена, воспроизводят пассивный нефрит Неуманна [6; 9]. Особенности воспроизведения данных моделей является их высокая стоимость, обусловленная техническими сложностями и расходами на содержание животных [7–9]. Мы позволили предложить способ создания модели хронического мембранозного гломерулонефрита, который проводится без технических и финансовых трудностей, со 100%-ной воспроизводимостью и по этиопатогенезу, клиническому течению и морфологической картине аналогичен процессу иммунного воспаления в ткани почек, наблюдаемому в клинике.

### **Материалы и методы**

Эксперимент выполнен на 17 животных – самцах и самках беспородных (нелинейных) белых крыс четырехмесячного возраста, массой  $170 \pm 59,2$  г, содержащихся в стандартных условиях вивария: содержание в пластиковых клетках с мелкой древесной стружкой, не более 10 особей в клетке. Пищевой рацион и питьевой режим вивария – стандартный. Вся экспериментальная часть работы проведена в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 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, n=8; II группа основная – животные, иммунизированные антигенной суспензией коркового слоя почки, n=9.

Для получения антигенной суспензии брали самку белой беспородной крысы, массой 170,8 г, имеющую потомство 4-месячного возраста. Сразу после декапитации (эвтаназию проводили под эфирным наркозом в соответствии с требованиями Женевской конвенции «International Guiding principles for Biomedical Research Involving Animals», 1990) почки перфузировали *in situ* стерильной охлажденной средой 199 до получения равномерного серо-коричневого цвета. После этого их отсекали от почечной ножки и переносили на стерильный лоток. Все последующие манипуляции выполнялись при температуре +4 °С. Отделив от капсулы, почки разрезали сагитально, выделяли корковый слой (масса 2-х почек составила 980 мг, масса коркового слоя – 686 мг), который затем суспендировали в стерильной ступке, измельчали в ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН–2Т, в режиме 44 мГц в течение 10

минут, затем переносили суспензию в центрифужный стаканчик, добавляя охлажденный физиологический раствор до 10 мл и 1 мг мертиолята в качестве антисептика. Полученную суспензию центрифугировали на холоде 3-кратно по 3 минуты (2 000 оборотов в минуту), каждый раз удаляли супернатант и доводили суспензию до 10 мл охлажденным физиологическим раствором. Затем центрифугировали еще раз при 5 000 оборотов в минуту в течение 10 минут, образовавшийся осадок осторожно переносили на стерильную фольгу, взвешивали на торсионных весах. Масса суспензионного осадка составила 360 мг. Полученный осадок состоял преимущественно из гломерул, которые хорошо визуализировались при микроскопии неокрашенных препаратов. Для приготовления антигенной суспензии брали 200 мг осадка и смешивали с 10 мл полного адьюванта Фрейнда (Disko-lab, USA) из расчета 1,0 мл на 20 мг осадка, который используется для усиления иммунного ответа и представляет собой масляную эмульсию, содержащую дериваты ланолина (жирные кислоты), липополисахариды микобактерий туберкулеза, инактивированные высокой температурой. Полученную взвешенную антигенную суспензию коркового слоя почки крысы хранили при температуре +4 °С. Иммунизацию животных проводили из расчета 100 мкл суспензии на 100 граммов массы тела по следующей схеме: 3-кратно внутрибрюшинно 1 раз в сутки с интервалом между иммунизацией в 1 день; повторно иммунизацию проводили через 3 недели внутрибрюшинно однократно в той же дозе.

Перед началом и во время эксперимента оценивали объективный статус животных (внешний вид, общую двигательную активность, потребность в еде и питье, 2 раза в неделю определяли массу тела); выделительную функцию почек по количеству спонтанных мочеиспусканий за сутки; в разовой порции мочи, используя качественную реакцию с 20%-ной сульфосалициловой кислотой, определяли белок. Забор крови для биохимического анализа у животных контрольной и основной групп осуществлялся перед началом и по окончании эксперимента методом прижизненной пункции сердечной сумки, утром натощак. На биохимическом анализаторе StatFax 1904+ с помощью набора реактивов Spinreact (USA) определяли общий белок, мочевины, креатинин, холестерин, щелочную фосфатазу (ЩФ), активность аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), фосфор, калий.

По окончании опыта животных выводили из эксперимента путем перерезки спинного мозга под эфирным наркозом с соблюдением правил эвтаназии. Внутренние органы забирали для проведения гистологического исследования. Материал фиксировали в нейтральном забуференном формалине, подвергали обезвоживанию в спиртах возрастающей крепости, заливали в парафин. Срезы получали на ротационном микротоме (толщина 3-4 мкм), окрашивали гематоксилином и эозином, 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 изображений осуществляли при помощи камеры для микроскопа CAM V200 Micros «Handelsgesellschaft m.b.H.» (Австрия). Морфометрический анализ полученных изображений проводили, используя специализированное программное обеспечение для медицины и биологии BioVision, version 4.0 (Австрия). Для обеспечения достоверности данных при определении каждого параметра использовали серию дублирующих измерений, не менее чем в 10 полях зрения микроскопа в каждом гистологическом препарате. Проанализированы следующие параметры: толщина париетального листка капсулы Шумлянско-Боумена, площадь клубочка с капсулой, мочевого пространства на срезах, проходящих по максимальному диаметру почечного тельца, площадь капиллярных петель с интерстициальным пространством.

Для статистической обработки полученных результатов использовали вычисление средних значений и их стандартных ошибок, сравнение между собой двух выборок проводили при помощи критерия Манна–Уитни. Анализ данных выполнен с использованием программы Biostat для Windos.

## **Результаты**

Все животные контрольной группы отличались активным поведением, имели стабильную еженедельную прибавку в массе (за весь период эксперимента прибавка составила  $80,9 \pm 0,56$  г), проявляли интерес к еде, питью. У них были блестящие глаза, шерсть, видимые слизистые влажные и розовые. Количество мочеиспусканий за сутки в среднем составляло 5–6 раз. Лабораторных признаков развития заболеваний выявлено не было. При гистологическом исследовании в почках четко выявлялась капсула, корковое вещество с почечными тельцами и извитыми канальцами, мозговое вещество. Хорошо визуализировались мозговые лучи, глубоко вдающиеся в корковое вещество почки, сосочек и почечная лоханка, выстланная переходным эпителием. Прямые канальцы в мозговом веществе и собирательные трубочки были без особенностей. Сосудистые клубочки не были изменены, мочевые пространства свободны, капсула Шумлянско-Боумена не утолщена. Между почечными тельцами находились проксимальные и дистальные почечные канальцы с типичной структурой. Стенки сосудов имели типичное строение, не утолщены, эндотелий представлен одним слоем плоских клеток, лежащих на базальной мембране.

У животных II группы к концу 1-й недели после иммунизации изменилось поведение: снижение общей двигательной активности наблюдали у 40%, к 3 неделе отмечали проявление адинамии у 100% крыс. К концу 3-й недели шерсть животных стала тусклой, взъерошенной, со следами экскрементов, они плохо ухаживали за собой. Видимые слизистые

– сухие, бледные, глаза тусклые. Снизилась потребность в еде (оставляли небольшой объем корма после порционного кормления), однако потребность в жидкости при этом увеличилась. В основной группе прибавка в массе за весь период эксперимента составила  $36,7 \pm 0,42$  г ( $p < 0,001$ ). Общее количество мочеиспусканий было снижено до 3–4 раз в сутки, к 14–20 дню эксперимента в разовых порциях мочи определяли протеинурию у всех животных. В сыворотке крови у животных основной группы определялось достоверное увеличение концентрации креатинина  $189,90 \pm 14,72$  ммоль/л, ( $p < 0,06$ ) и уменьшение содержания общего белка  $53,63 \pm 0,86$  г/л ( $p < 0,06$ ).

При проведении гистологического и морфометрического исследований аутопсийного материала в ткани почек выявлялось полнокровие перитубулярных капилляров, дуговых и междольковых сосудов. Более чем в 60% увеличенных клубочков отмечалась диффузная мезангиальная пролиферация со значительным уменьшением мочевого пространства, отёком и утолщением париетального листка капсулы Шумлянско–Боумена, в ряде случаев с формированием клеточных полулуний, что имело достоверное отличие ( $p < 0,05$ ) с контрольной группой животных (табл. 1).

Таблица 1 – Морфометрические показатели параметров почечного тельца почки лабораторных животных

Структура	Параметры	Контрольная группа, n=8 (M±m)	Основная группа, n=9 (M±m)
Почечное тельце	Толщина париетального листка капсулы Шумлянско–Боумена, мкм	$0,437 \pm 0,088$	$1,873 \pm 0,031^*$
	Площадь клубочка с капсулой Шумлянско–Боумена, мкм <sup>2</sup>	$5\,394,8 \pm 839,3$	$7\,489,01 \pm 512,2^*$
	Площадь мочевого пространства в почечном тельце, мкм <sup>2</sup>	$1\,565,6 \pm 344,1$	$931,04 \pm 119,5^*$
	Площадь капиллярных петель клубочка, мкм <sup>2</sup>	$3\,872,1 \pm 584$	$5\,161,4 \pm 138,1^*$

\*  $p < 0,05$  по сравнению с контрольными животными.

Отмечалась деструкция и деформация капиллярных стенок с образованием тромбов в просветах капилляров. В части клубочков при окрашивании серебром по Футу выявляли шипики на гломерулярной базальной мембране. В интерстиции и канальцах почек наблюдался отек тканей, очаги воспаления и склероза. В проксимальных и дистальных канальцах была выражена атрофия эпителия с уплощением стенок, дистрофические изменения эпителия и наличие белковых цилиндров в просветах канальцев.

## Обсуждение

Предложенная нами модификация модели нефрита Неуманна позволяет со 100%-ной вероятностью воспроизвести экспериментальный хронический гломерулонефрит. Адекватность воссоздания модели подтверждается изменениями биохимических, гистологических и морфометрических показателей крови и ткани почек животных, а также рядом объективных симптомов. Для подтверждения диагноза и выявления метаболических нарушений особую ценность представляет определение концентрации креатинина в крови, т.к. он, являясь компонентом остаточного азота, выводится с мочой путем гломерулярной фильтрации и не подвергается реабсорбции в почечных канальцах. Повышение уровня этого метаболита в крови вызвано снижением фильтрационной функции почек. Содержание креатинина в крови здоровых животных достаточно стабильно, не зависит от поступления белков с кормом и интенсивности процессов расщепления их в организме. Достоверное увеличение концентрации креатинина в сыворотке иммунизированных животных к концу эксперимента более чем в 3 раза ( $189,90 \pm 14,72$  ммоль/л при норме  $59,93 \pm 2,32$  ммоль/л), позволяет говорить о поражении практически 50% клубочков.

Подтверждением наличия нефропатии служит также установленное нами достоверное снижение общего белка в сыворотке крови при увеличении его содержания в моче у иммунизированных животных ( $53,63 \pm 0,86$  г/л при норме  $71,46 \pm 1,63$  г/л). Предсказать, насколько обратимы изменения концентрации креатинина и общего белка в сыворотке крови, учитывая только клиническую информацию, невозможно без анализа почечного биоптата. Внутривентрикулярное введение по представленной схеме почечного субстрата в качестве антигенного белка из расчета 100 мкл суспензии на 100 граммов массы тела запускает аутоиммунный процесс. Аутологичные иммунные комплексы, активирующие систему комплемента, откладываются на базальной мембране клубочков, реализуя тем самым повреждающее действие. В очаг повреждения привлекаются воспалительные клетки (моноциты-макрофаги, нейтрофилы, тромбоциты и др.), активируясь, они выделяют повреждающие факторы (активные радикалы кислорода, прокоагулянтные молекулы, протеазы и др.), а также цитокины (интерлейкин-1, фактор некроза опухоли, тромбоцитарный фактор роста и др.), которые стимулируют пролиферацию собственных клеток почечных клубочков (мезангиальных, эндотелиальных, эпителиальных). Наряду с пролиферацией они усиливают синтез внеклеточного матрикса, избыточное накопление которого является морфологическим субстратом прогрессирующей потери почечной функции. Эти иммунологические изменения нашли своё подтверждение при гистологическом и морфометрическом анализе почечных структур экспериментальных

животных. В ходе эксперимента все животные оказались «отвечающими», то есть высоко восприимчивы к данной модификации модели.

### **Вывод**

Таким образом, клинические, биохимические изменения, гистологический и морфометрический анализ почечных структур позволяют с высокой степенью достоверности подтвердить успешное воспроизведение модели гломерулонефрита у экспериментальных животных и рекомендовать использовать белых нелинейных крыс и разработанную модель в дальнейших доклинических исследованиях.

### **Список литературы**

1. Бурова Л.А., Гаврилова Е.А., Пигаревский П.В. и др. Связывание стрептококками группы А типа М12 иммунных комплексов: роль данного связывания в патогенезе экспериментального гломерулонефрита // Мед. иммунология. – 2006. – № 8. – С. 124-125.
2. Кропачев А.Ю., Соснин Г.А., Скляренко Д.А. и др. Разработка модели и морфологическая характеристика почек при неполной (варьирующей) окклюзии мочевыводящих путей // Бюлл. Волгоградского науч. центра РАМН. – 2008. – № 1. – С. 24-26.
3. Меньшикова Е.Б., Шабалина И.Г., Зенков Н.К., Колосова Н.Г. Генерация активированных кислородных метаболитов митохондриями преждевременно стареющих крыс OXYS // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 2002. – № 133 (2). – С. 175-177.
4. Пальцева Е.М. Экспериментальные модели хронических заболеваний почек // Клиническая нефрология. – 2009. – № 2. – С. 37-42.
5. Ronco P., Debiec H. Molecular Pathomechanisms of Membranous Nephropathy: From Heymann Nephritis to Alloimmunization // J. Am. Soc. Nephrol. – 2005. – № 16. – P. 1205-1213.
6. Shah P., Tramontano S., Makker P. Intramolecular Epitope Spreading in Heymann Nephritis / P. Shah, S. Tramontano, P. Makker // J. Am. Soc. Nephrol. – 2007. – № 18 (12). – P. 3060-3066.
7. Tramontano A., Knight T., Vizzuso D., Makker S.P. Nested N-Terminal Megalin Fragments Induce High-Titer Autoantibody and Attenuated Heymann Nephritis // J. Am. Soc. Nephrol. – 2006. – № 17 (7). – P. 1979-1985.
8. Kerjaschki D., Neale T.J. Neale Molecular mechanisms of glomerular injury in rat experimental membranous nephropathy (Heymann nephritis) // J. Am. Soc. Nephrol. – 1998. – № 7. – P. 2518-2526.
9. Kawasaki K., Yaoita E., Yamamoto T., Kihara I. Depletion of CD8 positive cells in nephrotoxic serum nephritis of WKY rats // Kidney Int. – 1992. – № 41. – P. 1517-1526.

## **Рецензенты**

Демаков Виталий Алексеевич, д.м.н., профессор, член-корр. РАН, д-р Института экологии и генетики микроорганизмов Уро РАН, г. Пермь.

Сыропятов Борис Яковлевич, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологии ГОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия», г. Пермь.