УДК 616.611—002—092.9

Г. Н. Дранник, А. В. Соколов, Н. М. Петрунь,
Л. А. Мигаль, В. И. Мацуй

МОДЕЛИРОВАНИЕ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТА У СОБАК

При моделировании гломерулонефрита наибольшее распространение получили цитотоксический нефрит Мацуги [11] и аутоиммунный гломерулонефрит Хейманна и др. [10] с различными его модификациями [1—3]. Между тем, подавляющее число исследований, проведенных с использованием указанных методов, выполнено на мелких лабораторных животных. Кроме того, имеются сведения о том, что при индукции нефрита Мацуги хотя и удается получить нефрит, весьма сходный по морфологическим и клиническим признакам с диффузным гломерулонефритом у человека, однако развития аутоиммунного противопочечного компонента при этой модели нефрита все же не происходит [5, 8, 12]. Наш опыт показывает, что воспроизведение нефрита у собак по методу Мацуги является малоэффективным. Что же касается модели нефрита Хейманна с соавт., которую мы также вызывали на собаках, то при индукции этой модели, в противоположность нефриту Мацуги, хотя и наблюдается выраженный аутоиммунный противопочечный компонент, однако морфологические и клинические признаки заболевания были характерны только для начальных этапов его развития [4].

Анализ литературы показал, что работ, посвященных моделированию гломерулонефрита у собак, чрезвычайно мало [16]. Между тем, моделирование гломерулонефрита на собаках, являясь более адекватным по отношению к человеку, чем на мелких лабораторных животных, позволяет проводить комплексные исследования, посвященные выяснению различных аспектов патогенеза этого заболевания. Кроме того, индукция гломерулонефрита у собак делает более доступным и более конкретным изучение влияния заболевания почек и сопровождающих его иммунопатологических нарушений на проявления разносторонних симптомов реакции отторжения почечного аллотрансплантата.

Методика исследований

Опыты проведены на восьми беспородных собаках. Под морфийно-гексеналовым наркозом у собаки удаляли одну почку, а в артерию оставшейся почки медленно вводили нефроцитотоксическую сыворотку (НЦТС) из расчета 0,5 *мл/кг*. НЦТС получали иммунизацией кроликов «сборным» антигеном, выделенным из коркового слоя почек десяти собак по методу, описанному Стеблаем и Леппером [17]. Полученную антисыворотку многократно абсорбировали тканью легкого, печени, а также эритроцитами собак. Окончательный титр НЦТС в реакции связывания комплемента с почечным антигеном составлял 1 : 80—1 : 100.

Корковый слой удаленной почки гомогенизировали, заливали физиологическим раствором в соотношении 1 : 5 и выдерживали в рефрижераторе (—10° С) в течение 5—7 *сут* при периодическом оттаивании и помешивании. Затем гомогенат пропускали через латунное сито с величиной отверстий 100 *мкм*, после чего центрифугировали в течение 5 *мин* при 1500 *об/мин* (получали так называемый первичный осадок, который подвергали обработке ультразвуком). Надосадочную жидкость собирали, еще раз центрифугировали в течение 45 *мин* при 10 000 *об/мин*, смешивали с первичным осадком, доводили содержание белка в смеси до 5—6% и использовали в качестве антигена.

Иммунизацию собак проводили через 3—4 *нед* после операции по следующей схеме: первая инъекция — под кожу паховых и подмышечных участков тела животного с полным адъювантом Фрейнда (в соотношении 1 : 1) вводили 200—250 *мг* белка (в эту порцию добавляли 50—70 *мг* гомогенизированного аутологичного коркового вещества). (Все последующие инъекции проводили внутримышечно без стимулятора Фрейнда). Вторая инъекция — через 7—10 дней после первой — 320—360 *мг* белка. Третья инъекция — через 4—5 дней — 430—480 *мг* белка и четвертая инъекция — через 3—4 дня — 520—580 *мг* белка.

В динамике опыта у экспериментальных животных определяли активность органоспецифического для почек фермента — трансамидиназы [6], содержание креатинина и мочевины, уровень протеинурии, комплементсвязывающие противопочечные антитела и титр общего комплемента (в качестве титра комплемента считалось наименьшее количество разведенной 1 : 5 сыворотки собаки, вызывавшей полный гемолиз индикаторной системы [7]). Изучали также степень миграции лейкоцитов в присутствии аутологичного и изологичного «сборного» антигенов [14, 15].

Пссле проведения биопсии ткани почек окрашивали гематоксилин-эозином, по ван-Гизону, выявляли фибрин по Шуенинову, импрегнировали азотнокислым серебром по Гомори и Джонс-Моури, проводили реакции определения нейтральных и кислых гликозаминогликанов (PAS — реакция, окраска альциановым синим). Гликоген идентифицирован амилазой слюны.

Результаты исследований и их обсуждение

Как видно из таблицы, контрольные исследования не выявили патологических изменений почек и иммунной системы животных. При обследовании собак в различные сроки после начала индукции гломерулонефрита обнаружены изменения, характерные для поражения почек с выраженными иммунопатологическими, биохимическими и морфологическими нарушениями.

Результаты обследования собак с индуцированным гломерулонефритом

№ собаки	Дата обследования	До (верхняя строка) и после индукции (нижняя строка)						
		трансамидиназа, в усл. ед.	креатинин, в *мг* %	мочевина, в *мг* %	протеинурия, в ‰	индекс миграции лейкоцитов	$\log_2$ титра антител в РСК	титр комплемента
1	11. 12. 73	0	0,5	20,5	0	1,0	0	0,15
	27. 1. 75	1,0	7,4	160,0	11,5	0,5	4,33	0,40
2	11. 12. 73	0	1,0	31,0	0	1,0	0	0,20
	16. 12. 74	1,05	6,7	110,0	6,6	0,5	4,91	0,35
3	5. 3. 74	0	0,8	31,0	0	1,2	0	0,20
	20. 1. 75	0,90	8,2	170,0	8,2	0,3	3,32	0,45
4	5. 3. 74	0	0,5	52,0	0	1,1	0	0,15
	10. 2. 75	1,2	9,6	140,0	11,5	0,4	0	0,40
5	26. 3. 74	0	1,5	45,0	0	1,0	0	0,15
	19. 6. 74	0,95	7,2	140,0	8,2	0,65	0	0,40
6	26. 3. 74	0	1,2	60,0	0	1,2	0	0,20
	19. 6. 74	1,1	4,6	120,0	4,7	0,5	0	0,45
7	26. 12. 74	0	1,5	28,0	0	1,0	0	0,25
	5. 5. 75	1,0	8,6	120,0	6,6	0,5	5,75	0,45
8	26. 12. 74	0	1,2	35,0	0	1,0	0	0,20
	5. 5. 75	1,1	7,8	191,5	8,2	0,6	5,91	0,45
$M \pm m$	до	0	1,03±0,05	37,8±4,4	0	1,08±0,03	0	0.19±0,01
	после	1,04±0,03	7,5±0,03	143,9±9,3	8,2±1,7	0,5±0,04	3,03±0,91	0,42±0,03
	$p <$	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

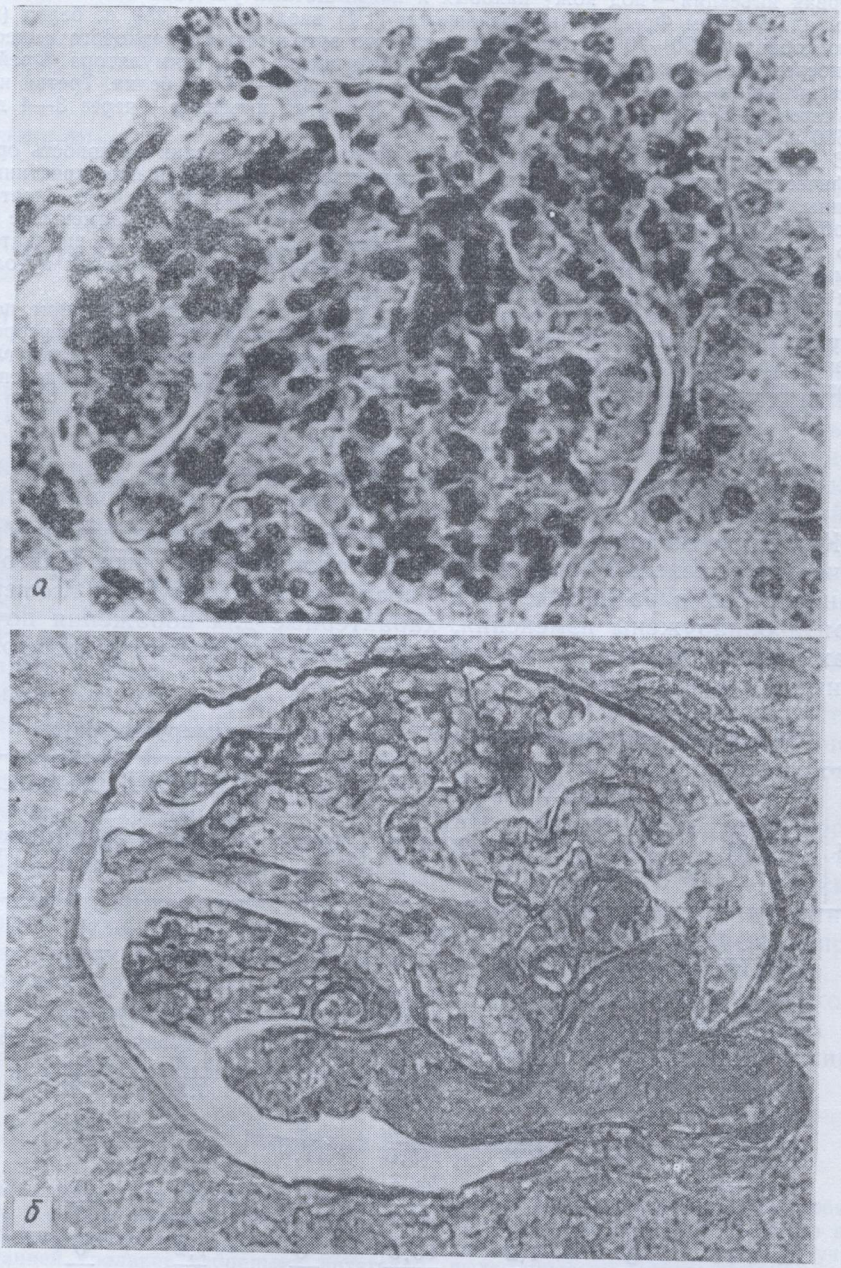

Рис. 1. Гисто-морфологические изменения почек на ранних этапах развития гломерулонефрита.

а — пролиферативный гломерулонефрит. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. ×400; *б* — отложение фибрина в сосудистой ножке клубочка. Окраска на фибрин по Шуенинову. Ув. ×400.

При анализе динамики изученных показателей у каждой собаки в отдельности оказалось, что развитие гломерулонефрита можно разделить на три этапа: этап ранних изменений, этап компенсации функции почки и этап резкого ухудшения функции почки.

Уже через несколько дней после введения НЦТС отмечалось небольшое повышение уровня креатинина и мочевины в крови. В плазме крови появлялась трансамидиназа, отсутствующая в этой биологической жидкости у здоровых животных, в моче обнаруживались следы белка. Динамика изменений титра общего комплемента характеризовалась резким падением уровня комплемента, с максимумом на четвертый час после введения НЦТС, с постепенным повышением его титра до исходных цифр к концу вторых суток. Морфологические изменения в почках на этом этапе были характерны для пролиферативного гломерулонефрита (рис. 1, *а*). В капиллярах клубочков выявлялись отложения фибрина (рис. 1, *б*).

Следующий этап в развитии гломерулонефрита характеризовался некоторой стабилизацией функции почки (длительность именно этого этапа определяла интервал времени, в течение которого развивались выраженные признаки поражения почек). В этот период в циркулирующей крови появлялись комплементсвязывающие противопочечные антитела, однако титры и сроки их появления у собак были различными. У одних животных антитела обнаруживались уже через 3—5 *нед* после иммунизации, у других — спустя 3—4 мес. Наиболее характерным для всех собак была волнообразность изменения антител: появление антител чередовалось с их исчезновением. Титр общего комплемента прогрессивно снижался, обнаруживая при этом пики повышения комплементарной активности. Отмечалось усиление степени ингибиции миграции лейкоцитов. Заметим, что подавление миграции лейкоцитов было выражено также и при использовании в реакции изологичного почечного антигена. Морфологически этот этап характеризовался развитием выраженного мембранозного гломерулонефрита с явлениями набухания, утолщения и раздвоения мембран капилляров клубочков. Особенно четко эти изменения были видны при импрегнации ткани почки азотнокислым серебром по Джонс-Моури (рис. 2, *а*). Утолщенные мембраны капиллярных петель отличались выраженным накоплением PAS-положительных веществ с преобладанием нейтральных гликозаминогликанов негликогеновой природы. Довольно часто в интерстиции почки встречались мелкие, преимущественно перигломерулярные лимфоцитарные инфильтраты (рис. 2, *б*). Обращает на себя внимание, что продолжительность этапа компенсации функции почки была тем меньшей, чем быстрее в организме животного появлялись циркулирующие антитела и иммунные лимфоциты. Именно в этот период появлялась стойкая протеинурия и высокий уровень трансамидиназной активности в крови. Подобные изменения были отмечены и другими исследователями при индукции гломерулонефрита у крыс [9].

Можно думать, что прогрессирование заболевания обусловлено развитием иммунопатологических нарушений в организме экспериментального животного.

То что подавление миграции лейкоцитов отмечалось также в присутствии изологичного почечного антигена, можно объяснить наличием в почке общих видовых и органных антигенов [13]. Это обстоятельство позволяет думать о том, что удаление собственной почки для приготовления из нее антигена, по-видимому, не является совершенно обязательным условием. По всей вероятности, для этой цели можно использовать антигены, выделенные из почек других собак (изоантигены), тем

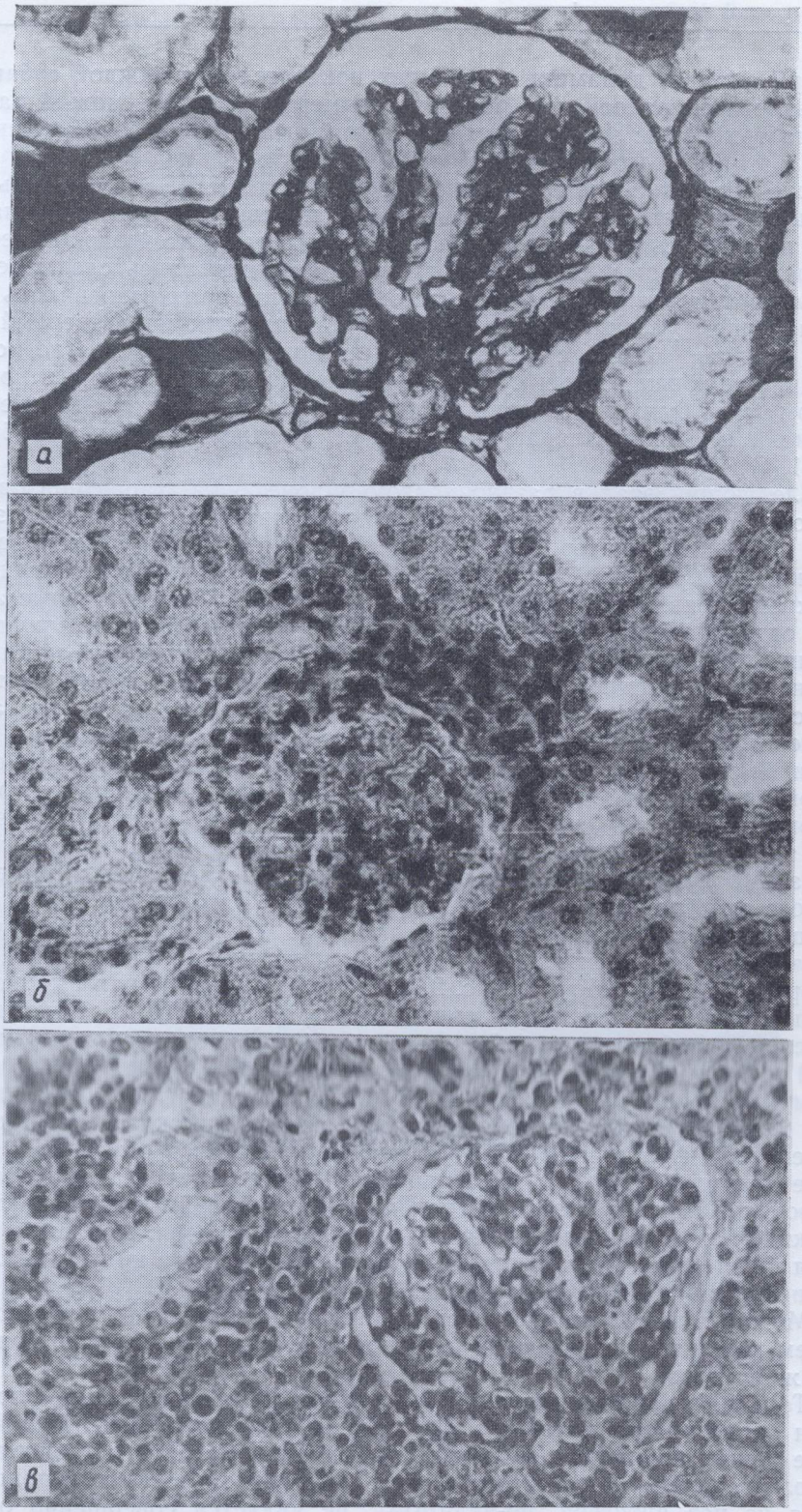

Рис. 2. Гисто-морфологические изменения при развитии хронического гломерулонефрита.

а — мембранозный гломерулонефрит. Импрегнация азотнокислым серебром по Джонс-Моури. Ув. ×300; *б* — перигломерулярная, преимущественно лимфоцитарная, инфильтрация. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. ×200; *в* — пролиферативно-фибропластический гломерулонефрит. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. ×280.

более, что индуцируемый в наших опытах гломерулонефрит не является чисто аутоиммунным из-за использования гетерологичной НЦТС.

И, наконец, последний этап характеризовался резким ухудшением функции почки. При морфологическом исследовании отмечалось развитие пролиферативно-фибропластического гломерулонефрита (рис. 2, *в*).

Таким образом, проведенные опыты показали, что примененный способ индукции гломерулонефрита у собак позволяет вызывать поражение почек с четким иммунопатологическим компонентом, что подтверждается всем комплексом проведенных исследований — иммунологических, биохимических и морфологических.

Литература

1. *Быковская К. Н.* Экспериментальный аутоиммунный гломерулонефрит у крыс и его лечение преднизолоном. Автореф. канд. дис. М., 1968. 28 с.
2. *Варшавский В. А., Артемова А. Г.* К патогенезу аутоиммунного нефрита. Труды III Всесоюзной конференции по иммунопатологии. Л., 1969, с. 55—57.
3. *Вихерт А. М., Соколова Р. И., Быковская К. Н.* Экспериментальная модель аутоиммунного гломерулонефрита.— Архив патологии, 1973, № 11, с. 15—20.
4. *Дранник Г. Н.* Аутоиммунный гломерулонефрит и возможности его влияния на трансплантат почки.— Врачебное дело, 1971, № 8, с. 15—17.
5. *Дранник Г. Н.* Получение аутоиммунного процесса при моделировании гломерулонефрита. Труды II съезда урологов УССР, Киев, 1974, с. 229—231.
6. *Мардашев С. Р., Карелин А. А.* Определение трансамидиназы в сыворотке крови и моче при поражении почек и поджелудочной железы.— В сб.: Методы исследования активности некоторых ферментов в клинике. М., 1967, с. 67—76.
7. *Мурашова А. И.* Реакция связывания комплемента.— В кн.: Лабораторная иммунология (ред. О. Е. Вязов), 1967, с. 156.
8. *Boss G. H., Silber E., Nelken D.* Antibodiens to species homologous tissue antigens in rats circulating antibodies in the process of developing the autoimmune renal desease.— Clin. and Exp. Immunol., 1967, **2**, N 4, p. 455—467.
9. *Dihn B. L., Brossard A., Katiyar V. N.* Experimental glomerulonephritis induced with the majer antigen of rat kidney.— Int. Arch. Allergy and Appl. Immunol., 1972, **43**, p. 131—144.
10. *Heymann W., Hackel D. B., Harwood S., Wilson S. C. F., Hunter J. L. P.* Production of nephrotic syndrom in rats by Freund's adjuvants and rat kidney suspensions.— Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.), 1959, **100**, p. 660—669.
11. *Masugi M.* Uber die experimentalle glomerulonephritis durch das spezifische antinierenserum ein beltrag sur pathogenese der diffurer glomerulonephritis.— Beitr. path. Anat., 1934, **92**, s. 429—442.
12. *Rother K.* Aktuelle probleme der autosensibilisierung der glomerulonephritis.— Int. Arch. Allerg., 1963, **22**, N 5, s. 306—312.
13. *Shulman S.* Kidney antigens active in isoimmunization. 1. The antigennic diversite.— Immunology, 1969, **17**, p. 641—652.
14. *Söborg M., Bendixen G.* Human lymphocyte migration as a parameter of Hypersensitivity.— Acta med. Scand., 1967, **181**, p. 247—256.
15. *Söborg M.* In vitro migration of peripheral human leycocytes in cellular hypersensitivity.— Acta med. Scand., 1968, **184**, p. 135—139.
16. *Steblay R. W., Lepper M. H.* Some immunologic properties of human and dog glomerular basement membranes. 1. Isolation of human glomerular Basement membrane similar or identical. Complement-Fixing Antigens in human and dog glomerular basement membrane preparations.— J. Immunology, 1961, **87**, N 6, p. 627—635.
17. *Steblay R. W., Lepper M. H.* Some immunologic properties of human and dog glomerular basement membranes. 2. Nephritis produced in dogs by rabbit antihuman glomerular basement membrane sera.— J. Immunology, 1961, **87**, N 6, p. 636—646.

Лаборатории патологической физиологии,
биохимии и патологической морфологии
Киевского института урологии

Поступила в редакцию
11.VII 1977 г.