

## ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ ОСТРОГО ГЕМАТОГЕННОГО ПИЕЛОНЕФРИТА

Косарева П.В., Черешнев В.А.\*, Зимушкина Н.А., Логинова И.А., Самodelкин Е.И., Аверьянова Н.И.

\*Пермский государственный университет,

ГОУ ВПО Пермская государственная медицинская академия им. ак. Е.А. Вагнера Росздрава

Пермь, Россия

### Актуальность

Известные способы моделирования пиелонефрита основаны на введении в организм экспериментальных животных музейных и уропатогенных штаммов бактерий в высоких концентрациях –  $10^9$  КОЕ/мл и более (P. Larsson et al., 1980; Ю.М. Есилевский с соавт., 1982; G. Godaly et al., 2000; M. Cudic et al., 2003; Лукьянов А.В., с соавт., 2004; Fallahzadehi et al., 2004). Между тем, некоторые авторы рекомендуют проводить моделирование инфекционно-воспалительного процесса в органах мочевой системы у животных, используя меньшие концентрации вводимого различными путями инокула, поскольку использование для заражения животных высоких концентраций бактериальной суспензии даже уропатогенного штамма в большинстве случаев приводит к развитию помимо поражения органов мочевой системы системной воспалительной реакции, подчас проявляющейся в развитии сепсиса у животного, что, несомненно, искажает результаты проводимых экспериментов.

Так, А.К. Singal et al., 2005, рекомендует для моделирования пиелонефрита использовать 0,1 мл взвеси музейного штамма *Escherichia coli* в концентрации  $10^7 - 10^8$  КОЕ/мл непосредственно в почечную паренхиму. М. Le Burn et al. 1999, для моделирования пиелонефрита применяют введение инокула *Escherichia coli* в концентрации  $10^8$  КОЕ/мл непосредственно в левую почку крысы.

В связи с приведенными данными представляется целесообразным исследовать возможность моделирования гематогенного пиелонефрита у экспериментальных животных, используя для заражения бактериальную суспензию меньшей концентрации.

### Материалы и методы

Эксперимент выполнен на 30 животных - самках беспородных белых крыс четырехмесячного возраста, содержащихся в стандартных условиях вивария. Животные были разделены на три экспериментальных группы по 10 животных в каждой:

I группа (n=10) – контрольная (интактные животные);

II группа (n=10) – гематогенное заражение культурой *E. coli* в концентрации  $10^9$  КОЕ/мл;

III группа (n=10) - гематогенное заражение культурой *E. coli* в концентрации  $10^6$  КОЕ/мл.

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. Пиелонефрит у животных опытных групп моделировали интраперитонеальным введением бактериальной суспензии уропатогенного штамма лактозонегативной *Escherichia coli* по оригинальной методике, на которую подана заявка на изобретение и получена приоритетная справка №. 2007127373/14(029795) от 17.09.07 г. Концентрации бактериальных суспензий определяли нефелометрическим методом (КФК-3, кювета 1,060 мм, длина волны – 450 нм, оптические плотности суспензий – 0,012 и 0,026 соответственно).

В ходе проведения эксперимента наблюдали за поведением животных, их внешним видом, динамикой массы тела. Спустя 3 и 7 суток после заражения у животных регистрировали показатели периферической крови – уровень гемоглобина, количество эритроцитов и лейкоцитов, лейкоцитарную формулу. Фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови оценивали по отношению к формализированным эритроцитам барана в концентрации  $100 \times 10^6$  / мл в условиях 20-минутной инкубации при  $37^\circ\text{C}$  с помощью модификации микрометода (Каплин В.Н., 1996). После забора лабораторных показателей животных выводили из эксперимента путем перерезки спинного мозга под эфирным наркозом. Почки, печень, селезенку, легкие, толстую кишку и тонкую кишку забирали с целью проведения гистологического исследования. Для приготовления гистологических препаратов использовали стандартные методики, парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином и по методу ван Гизона. Одновременно в стерильных условиях осуществляли забор аутопсийного материала (почки, печень, селезенку) для проведения бактериологического исследования. Кусочки органов помещали в мясопептонный бульон и инкубировали 18-24 часа в термостате при температуре  $37^\circ\text{C}$ , после чего осуществляли посев на плотные питательные среды (кровяной агар). Посев материала на питательные среды осуществляли не позже 2 часов с момента забора анализа. Выделенные

чистые культуры идентифицировали по стандартным схемам микроскопией мазка, окрашенного по Граму, и изучением культуральных и биохимических свойств.

Результаты экспериментов подвергнуты статистической обработке с применением компьютерных программ Microsoft Excel и Biostat.

#### *Результаты и обсуждение*

У животных контрольной группы лабораторные, бактериологические, гистологические признаки пиелонефрита не выявляются.

Нами установлено, что при отсутствии терапии гематогенное заражение уропатогенной культурой *Escherichia coli* в концентрации  $10^9$  КОЕ/мл (группа II) вызывает у экспериментальных животных развитие пиелонефрита, о чем свидетельствуют исследованные в динамике показатели периферической крови и данные гистологического и бактериологического исследований аутопсийного материала.

При оценке показателей периферической крови к 7-му дню после заражения у животных, зараженных *Escherichia coli* в концентрации  $10^9$  КОЕ/мл, были выявлены достоверные изменения в периферической крови: увеличение числа лейкоцитов по сравнению с исходным уровнем ( $p < 0,001$ ) за счет появления юных форм, увеличения относительного и абсолютного числа палочкоядерных ( $p < 0,05$ ), сегментоядерных нейтрофилов ( $p < 0,05$ ), а также эозинофилов ( $p < 0,05$ ). При анализе фагоцитарной системы отмечалось достоверное снижение фагоцитарной активности лейкоцитов ( $p < 0,05$ ), фагоцитарного числа ( $p < 0,05$ ) и индекса ( $p < 0,05$ ). К 3-м суткам отмечалась тенденция формирования выявленных патологических изменений.

Бактериологические исследования аутопсийного материала, полученного от этих животных, выявили положительные результаты в 100% случаев в концентрации, превышающей  $10^3$  КОЕ/мл, что свидетельствует о наличии бактериемии у экспериментальных животных. При проведении гистологического исследования в почках экспериментальных животных были выявлены полнокровие сосудов стромы и ее инфильтрация лейкоцитами и макрофагами, зернистая дистрофия эпителия проксимальных канальцев, белковые цилиндры в просветах канальцев, воспалительная лимфогистиоцитарная инфильтрация с примесью нейтрофилов в слизистой оболочке и строме лоханок. Выявленные патоморфологические изменения свидетельствуют о развитии у животных острого пиелонефрита.

Помимо развития инфекционно-воспалительного процесса в органах мочевой системы у животных данной экспериментальной группы наблюдалась генерализация инфекции, о чем свидетельствовали результаты патогистологического исследования. Так, в тонкой кишке животных в строме ворсин под базальной мембраной отмечалась выраженная воспалительная лимфолейкоцитарная инфильтрация с примесью большого количества эозинофилов и макрофагов с пенистой цитоплазмой, некробиотические изменения энтероцитов, большое количество бокаловидных клеток. Отмечалась также интенсивная дегрануляция клеток Панета. В толстой кишке выявлено избыточное количество бокаловидных клеток, десквамированных в просвет кишки. В строме в основании слизистой оболочки – признаки отека, более выраженные, чем в тонкой кишке, воспалительная инфильтрация лимфогистиоцитарного характера с примесью нейтрофилов и плазматических клеток. Также признаком генерализации воспалительного процесса являлись очаги воспалительной инфильтрации в легких, нередко принимающие характер абсцессов.

В лимфоидной ткани селезенки экспериментальных животных выявлялись светлые центры размножения в фолликулах, в красной пульпе – крупные макрофаги с гиперхромными ядрами, выраженная лимфолейкоцитарная инфильтрация.

У животных, зараженных уропатогенным штаммом *Escherichia coli* в концентрации  $10^6$  КОЕ/мл, в периферической крови также отмечались изменения, свидетельствующие о развитии бактериального воспаления в организме животных. Так, в данной группе отмечалось достоверное увеличение количества лейкоцитов периферической крови ( $p < 0,05$ ) за счет увеличения относительного и абсолютного числа палочкоядерных ( $p < 0,05$ ) и сегментоядерных нейтрофилов ( $p < 0,05$ ).

Путем бактериологического исследования культура лактозонегативной *Escherichia coli*, по свойствам идентичная использованному для заражения штамму, была выделена из почек и селезенки в концентрации  $10^2$ - $10^3$  КОЕ/мл в 60% случаев.

Гистологические исследования в ткани почек экспериментальных животных данной группы выявили признаки воспаления: очаги воспалительной лимфолейкоцитарной инфильтрации в интерстиции почек, слизистой и строме лоханок, инфильтраты, окружающие сосуды. Кроме того, обнаружено резкое полнокровие коркового и мозгового вещества почек, в отдельных препаратах – тромбы в сосудах, дистрофические изменения канальцев и цилиндры в их просветах.

При проведении гистологического исследования внутренних органов животных в ткани легких были выявлены отдельные мелкие очаги воспалительной инфильтрации, не сливающиеся и не образующие абсцессы, а в селезенке также были выявлены светлые центры размножения в фолликулах, в красной пульпе – умеренная лимфолейкоцитарная инфильтрация.

Таким образом, использование для моделирования в эксперименте острого гематогенного пиелонефрита сравнительно низкой концентрации микробной суспензии –  $10^6$  КОЕ/мл позволяет получать выраженные воспалительные изменения в ткани

почек, сопровождающиеся бактериемией, подтверждаемой бактериологическими и гистологическими методами исследования, при этом в органах экспериментальных животных отсутствуют крупные очаги воспалительной инфильтрации, абсцессы, что, несомненно, способствует приближению модели к реальным условиям.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Есилевский Ю.М., Пытель Ю.А., Золотарев И.И., Пальцев М.А., Уфимцева А.Г. / Авторское свидетельство СССР № 511621, кл. С 09 В 23/28 от 21.01.1982.
2. Каплин В.Н. Нетрадиционная иммунология инфекций / В.Н. Каплин - Пермь: Издательство Пермской государственной медицинской академии, 1996. – 163 с.
3. Лукьянов А.В., Долгих В.Т., Потиевский Э.Г., Рейс Б.А., Соколова Т.Ф., Никонов В.М. / Моделирование острого пиелонефрита у животных различного вида // Бюллетень сибирской медицины. – 2004. - № 6. – С. 42-47.
4. Fallahzadehi M.H., Noorafshan A. / Iran J Med Sci – Vol. 29, No 3, September 2004, 130-133.
5. Larsson P., Kaijser B., Baltzer I.M., Olling S. / Journal of Clinical Pathology 1980; 33:408-412.
6. Le Burn M., Grenier L., Gourde P., Bergeron M.G. et al. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, May 1999, p. 1020-1026, Vol. 43, No. 5.
7. Singal A.K., Bajpai M., Dinda A.K. / Journal of Indian Association of Pediatric Surgeons. - 2005. – Vol. 10. – P. 20-24.