

УДК 616.61-008-002-57.081.4+616.155.32

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОЧЕК ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ НЕФРИТА С ПОМОЩЬЮ АДОПТИРОВАННЫХ ЛИМФОЦИТОВ**Юлдашев Н.М., Нишантаев М.К.***Ташкентский педиатрический медицинский институт, Ташкент, e-mail: y_nosir@rambler.ru*

Изучена возможность моделирования нефрита у крыс с помощью адоптированных лимфоцитов. О развитии нефрита судили по степени нарушения функционального состояния почек, которую определяли по содержанию креатинина и мочевины в сыворотке крови и моче, а также по суточному диурезу, скорости клубочковой фильтрации и реабсорбции. Изучалась степень эндогенной интоксикации по содержанию среднемолекулярных пептидов (СМП). Выявлено, что введение лимфоцитов, полученных от животных с экспериментальным нефритом к интактным животным, приводит к существенному повышению содержания креатинина и мочевины в сыворотке крови и моче у последних на 3 сутки. При этом на этот же срок наблюдается существенное снижение диуреза и скорости клубочковой фильтрации. Реабсорбция существенно не меняется. На 7 сутки практически все функциональные показатели нормализовались. Содержание СМП остается повышенным даже на 7 сутки. Делается вывод о возможности моделирования нефрита с помощью адоптированных лимфоцитов.

Ключевые слова: нефрит, креатинин, мочевина, диурез, скорость клубочковой фильтрации, реабсорбция, среднемолекулярные пептиды

FUNCTIONAL STATUS OF RENAL IN NEPHRITIS MODELING BY USING ADOPTED LYMPHOCYTES**Yuldashev N.M., Nishantaev M.K.***Tashkent pediatric medical institute, Tashkent, Republic of Uzbekistan, Tashkent, e-mail: y_nosir@rambler.ru*

The possibility of modeling nephritis in rats is learned via adopted lymphocytes. The development of nephritis was judged by the degree of violation of renal function, which was determined by creatinine and urea content in serum and urine, as well as daily diuresis, glomerular filtration rate and reabsorption. The degree of endogenous intoxication was learned by content of middle molecules. It's revealed that setting lymphocytes obtained from animals with experimental nephritis to intact animals, leads to a significant increase in the amount of creatinine and urea in the serum and urine of the last 3 days. There is a significant decrease in the urine output and glomerular filtration rate for the same period. Reabsorption doesn't change significantly. Almost all functional parameters normalized in 7 days. The content of middle molecules remains elevated even at 7th day. Conclusion is made about possibility of modeling nephritis via adopted lymphocytes.

Keyword: nephritis, creatinine, urea, diuresis, glomerular filtration, reabsorption, middle molecular peptides

В настоящее время не представляет сомнения, что для лимфоцитов характерна морфогенетическая функция [1]. Именно за счет морфогенетической функции лимфоциты могут осуществлять адоптивный перенос информации о состоянии организма на другую, интактный организм. В практическом плане большой интерес представляет возможности использования адоптированных лимфоцитов для моделирования патологических состояний почек. Это связано с тем, что модели патологии почек обычно воспроизводятся довольно длительное время. Так, имеется способ моделирования гломерулонефрита на кроликах, путем внутривенных инъекций сывороточных белковых антигенов. Для получения морфологически подтвержденной картины хронического гломерулонефрита требуется 6-12 месяцев [5]. По другой методике, половозрелым кроликам внутривенно вводят сывороточные белковые антигены на фоне стрессорного воздействия [6]. При этом

результат был достигнут в течение 4-х месяцев. Существует способ моделирования гломерулонефрита, введением животным антигенной суспензии коркового слоя почки [7]. При применении данного способа результат был достигнут в течение 1-го месяца, однако сам процесс получения антигенной суспензии довольно сложный и длительный.

Исходя из вышеизложенного, целью настоящего исследования явилась оценить возможность моделирования нефрита с помощью адоптированных лимфоцитов.

Материалы и методы исследования

Исследования были проведены на 157 белых беспородных крысах-самцах массой 160-230 г. Для моделирования острого нефрита животных заражали культурой вирулентной бактерий серотипа E. Coli. С этой целью под эфирным наркозом у животных вскрывали переднюю брюшную стенку, выделяли левую почку и с помощью тонкой иглы пункционно вводили непосредственно в паренхиму почки 250 патогенных единиц возбудителя в объеме 0,25 мл на изотониче-

ском растворе [3]. Рану наглухо ушивали. Животных забивали на 7 сутки течения экспериментальной патологии. Из брюшины выделяли лимфатические узлы и выделяли общие лимфоциты [4].

Выделенные лимфоциты были введены интактным животным внутривенно в дозе 5 млн. на животного. Забои животных, находящихся под эфирным наркозом, проводили путем декапитации на 1, 4 и 7 сутки после введения адаптированных лимфоцитов.

О функциональном состоянии почек судили по суточному диурезу, скорости клубочковой фильтрации (СКФ) и канальцевой реабсорбции, содержанию мочевины и креатинина в крови и моче экспериментальных животных. Сбор суточной мочи крыс осуществляли в метаболических камерах с использованием водной нагрузки (2 мл/кг веса, перорально). Суточный диурез выражали в мл в расчете на 100 г массы тела.

Скорость клубочковой фильтрации определяли по формуле:

$$\text{СКФ (мл/мин)} = (\text{Кр}_\text{м} / \text{Кр}_\text{к}) \cdot \text{минутный диурез}$$

где, $\text{Кр}_\text{м}$ и $\text{Кр}_\text{к}$ – концентрации креатинина в моче и крови, соответственно.

Канальцевую реабсорбцию рассчитывали по формуле:

$$\text{Реабсорбция (\%)} = \frac{(\text{СКФ} - \text{минутный диурез})}{\text{СКФ}} \cdot 100$$

Определение содержания мочевины в сыворотке крови и моче проводили по его цветной реакции с диацетилмонооксимом, используя унифицированные тест-наборы фирмы «Lachema» (Чехия). Содержание мочевины выражали в ммоль/л для сыворотки крови и ммоль в суточном объеме мочи. Определение содержания креатинина в сыворотке крови и моче основано на цветной реакции Яффе. В результате реакции креатинина с пикриновой кислотой в щелочной среде образуется оранжево-красное окрашивание, обусловленное образованием таутомера пикрата, интенсивность которого пропорциональна концентрации креатинина. Содержание креатинина выражали в ммоль/л для сыворотки крови и моль/сут для мочи.

Для оценки степени интоксикации, обычно характерной для почечных болезней, определяли также содержание среднемолекулярных пептидов (СМП) методом [2]. Способ заключается в осаждении 10% трихлоруксусной кислотой грубодисперсных белков

с последующей детекцией элюирующей фракции при длине волны 254 и 280 нм. При длине волны 254 нм детектируются общая сумма СМП, а при 280 нм – пептиды, содержащие ароматические аминокислоты. Уровень СМП выражали в условных единицах, количественно соответствующих данным экстинкции.

Все цифровые результаты подвергали статистической обработке с применением критерия t Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследований показали, что острый нефрит, вызванный введением *E. coli*, приводит к существенным изменениям в содержании креатинина и мочевины. Так, содержание креатинина в сыворотке крови было повышено на 124%, а – мочевины на 79,8% от нормальных значений (табл. 1). В моче содержание креатинина превышало норму на 56,8%, а – мочевины на 79,2%.

Изучение содержания креатинина и мочевины в сыворотке крови и моче крыс при введении им адаптированных лимфоцитов показало, что на 1 сутки эксперимента наблюдается только тенденция к их повышению. На 4 сутки эксперимента содержание креатинина в сыворотке крови и моче оказалось выше нормальных показателей на 76 и 34,1% соответственно, а – мочевины соответственно на 72,2 и 41,5%. При этом значения креатинина и мочевины как в сыворотке крови, так и в моче оказались несколько ниже по сравнению с аналогичными показателями крыс с острым нефритом, вызванным введением *E. coli*. На 7 сутки эксперимента несколько повышенным по сравнению с нормальными показателями оказалось только содержание креатинина как в сыворотке крови, так и в моче. Содержание мочевины в сыворотке крови и моче статистически значимо от нормальных значений не отличалось.

Таблица 1

Динамика изменений содержания креатинина и мочевины при остром нефрите и введении адаптированных лимфоцитов у крыс

Группы		Сыворотка крови		Моча	
		Креатинин, ммоль/л	Мочевина, ммоль/л	Креатинин, моль/сут	Мочевина, ммоль/сут
Интактные		0,125 ± 0,005	3,95 ± 0,12	1,85 ± 0,09	260 ± 12
Острый нефрит 4 сутки		0,280 ± 0,010*	7,10 ± 0,56*	2,90 ± 0,16*	466 ± 23*
Введение адаптированных лимфоцитов	1 сут	0,132 ± 0,005 ^а	4,10 ± 0,25 ^а	1,96 ± 0,12 ^а	286 ± 15 ^а
	4 сут	0,220 ± 0,012 ^{*а,б}	6,80 ± 0,30 ^{*б}	2,48 ± 0,18 ^{*а,б}	368 ± 31 ^{*а,б}
	7 сут	0,146 ± 0,009 ^{*а,в}	4,11 ± 0,25 ^{а,в}	2,10 ± 0,13 ^{а,в}	251 ± 28 ^{а,в}

Примечание. * – $P < 0,05$ по сравнению с интактным значением; а – $P < 0,05$ по сравнению со значением острого нефрита 4 сут; б – $P < 0,05$ по сравнению со значением 1 сут; в – $P < 0,05$ по сравнению со значением 3 сут.

Таблица 2

Динамика изменений функции почек при остром пиелонефрите и при введении адаптированных лимфоцитов у крыс

Группы		Диурез, мл/сут	Скорость клубочковой фильтрации, мл/мин	Реабсорбция, %
Интактные		6,25 ± 0,20	0,064 ± 0,002	93,2 ± 4,9
Острый нефрит 4 сутки		1,80 ± 0,15*	0,013 ± 0,002*	90,3 ± 3,5
Введение адаптированных лимфоцитов	1 сутки	6,10 ± 2,25 ^a	0,062 ± 0,005 ^a	93,2 ± 2,5
	4 сутки	2,8 ± 0,12 ^{*,a,b}	0,022 ± 0,003 ^{*,a,b}	91,2 ± 3,1
	7 сутки	6,11 ± 0,28 ^{a,b}	0,061 ± 0,004 ^{a,b}	93,0 ± 2,8

Примечание. * – $P < 0,05$ по сравнению с интактным значением; а – $P < 0,05$ по сравнению со значением острого нефрита 4 сут; б – $P < 0,05$ по сравнению со значением 1 сут; в – $P < 0,05$ по сравнению со значением 3 сут.

Таблица 3

Динамика показателей СМП в сыворотке крови и моче крыс с острым нефритом и при введении адаптированных лимфоцитов

Группы		СМП, отн. ед.			
		254 нм		280 нм	
		Сыворотка	Моча	Сыворотка	Моча
Интактные		0,180 ± 0,012	0,265 ± 0,020	0,076 ± 0,004	0,120 ± 0,007
Острый нефрит 4 сут		0,280 ± 0,031*	0,510 ± 0,046*	0,188 ± 0,015*	0,256 ± 0,019*
Введение адаптированных лимфоцитов	1 сут	0,195 ± 0,015 ^a	0,281 ± 0,025 ^a	0,095 ± 0,009 ^{*,a}	0,156 ± 0,008 ^{*,a}
	4 сут	0,258 ± 0,010 ^{*,b}	0,458 ± 0,035 ^{*,b}	0,155 ± 0,012 ^{*,a,b}	0,225 ± 0,020 ^{*,b}
	7 сут	0,225 ± 0,010 ^{*,a,b,в}	0,298 ± 0,014 ^{a,в}	0,125 ± 0,009 ^{*,a,b,в}	0,195 ± 0,009 ^{*,a,b,в}

Примечание. * – $P < 0,05$ по сравнению с интактным значением; а – $P < 0,05$ по сравнению со значением острого нефрита 4 сут; б – $P < 0,05$ по сравнению со значением 1 сут; в – $P < 0,05$ по сравнению со значением 3 сут.

Острый нефрит, вызванный введением *E. coli*, привел к существенным изменениям в функции почек. Так, диурез оказался сниженным на 71 %, а скорость клубочковой фильтрации на 80 % (табл. 2). При этом реабсорбция практически не изменилась.

Введение адаптированных лимфоцитов привело также к изменению функции почек. Так, на 1 сутки эксперимента существенных изменений в состоянии диуреза, скорости клубочковой фильтрации и реабсорбции не наблюдались. На 4 сутки эксперимента диурез у крыс оказался сниженным на 55,2 %, а скорость клубочковой фильтрации на 65,6 % по сравнению с нормальными показателями. При этом диурез оказался выше на 55,6 %, а значение скорости клубочковой фильтрации на 69,2 % показателя крыс с пиелонефритом, вызванным введением *E. coli*. На 7 сутки эксперимента значения диуреза и скорости клубочковой фильтрации практически не отличались от нормальных значений.

Примечательно, что значение реабсорбции в течение всего эксперимента статисти-

чески значимо не отличалось от нормально-го показателя.

Исследования показали также существенные изменения в содержании СМП как в сыворотке крови, так и в моче у крыс с острым нефритом, вызванным введением *E. coli*. Так, содержание пептидов, определенное при 254 нм было увеличено на 55,6 и 92,5 % в сыворотке крови и моче, соответственно (табл. 3). Содержание пептидов, определенное при 280 нм было еще сильнее увеличено (на 147,4 и 113,3 % в сыворотке крови и моче, соответственно).

В сыворотке крови и моче экспериментальных животных, получивших адаптированные лимфоциты, содержание СМП, определенных при 254 нм, на 1 сутки практически не изменилось. Существенные изменения в содержании СМП, определенное при 254 нм, наблюдались на 4 сутки эксперимента. Так, в сыворотке крови оно было выше на 43,3 %, а в моче на 72,8 % по сравнению с нормальными показателями. При этом они все же оказались несколько ниже

по сравнению с показателями животных с острым нефритом, вызванным *E. coli*. На 7 сутки эксперимента содержание СМП, определенное при 254 нм, в сыворотке крови оказалось выше нормы на 25%. Повышенное их содержание на 12,5% в моче оказалось статистически не значимым.

Содержание СМП, определенное при 280 нм, в отличие от СМП, определенное при 254 нм, уже на 1 сутки эксперимента в сыворотке крови и моче оказалось выше нормальных значений на 25 и 30% соответственно. На 4 сутки эксперимента оно уже превышало норму на 104,0 и 87,5% в сыворотке крови и моче соответственно. При этом абсолютные значения этих показателей все же оказались несколько ниже аналогичных показателей у крыс с острым нефритом, вызванным *E. coli*. И, наконец, на 7 сутки эксперимента содержание СМП, определенное при 280 нм, в сыворотке крови оказалось выше на 64,5%, а в моче – 62,5% по сравнению с нормальными показателями.

Следовательно, полученные нами данные свидетельствуют о развитии выраженной эндогенной интоксикации у крыс при введении им лимфоцитов, полученные из животных с острым нефритом, вызванным введением *E. coli*. Значения показателей эндотоксемии в данном случае оказались несколько ниже по сравнению с показателями крыс с острым нефритом, вызванным введением *E. coli*.

Таким образом, введение крысам лимфоцитов, выделенных из животных с острым нефритом, вызванным введением *E. coli* приводит к изменениям функции почек, при этом характер изменений соответствует нефриту.

Работа выполнена на основании прикладного научного гранта Республики Узбекистан 31.11 «Создание новых моделей патологических состояний с помощью адаптированных лимфоцитов».

Список литературы

1. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Зотиков Е.А. Роль лимфоцитов в оперативном изменении программы развития тканей. – М.: Издательство РАМН, 2009. – 108 с.
2. Габриэлян Н.Н., Левицкий Э.Р., Щербанова О.И. Гипотеза средних молекул в практике клинической нефрологии // Тер. архив. – 1983. – № 6. – С. 76-78.
3. Каримов Х.Я., Ахмедов Р.Н., Иноятова Ф.Х. Нарушение содержания простагландина Е2 в почечной ткани крысы при пиелонефрите и способы его коррекции // Патология. – 1999. – № 1. – С. 24-26.
4. Методические материалы по экспериментальному (фармакологическому) и клиническому испытанию иммуномодулирующего действия фармакологических средств (Методическое руководство). М., 1984. – 37 с.
5. Моделирование острого пиелонефрита у животных различного вида / В.Т. Долгих, Б.А. Рейс, Э.Г. Потиевский, Т.Ф. Соколова, А.В. Лукьянов, В.М. Никонов // Бюллетень сибирской медицины. – 2006. – № 4. – С. 42-47.
6. Способ моделирования гломерулонефрита. А.И. Тюкавин, С.И. Кузнецов, Р.П. Огурцов, М.И. Павликова, О.В. Рыницын. Патент RU № 2134454.
7. Способ моделирования хронического гломерулонефрита в эксперименте. Н.Ю. Коломеец, П.В. Косарева, Н.И. Аверьянова, В.А. Черешнев. Патент RU № 2384893.