

Моделирование острого пиелонефрита у животных различного вида

Лукьянов А.В.¹, Долгих В.Т.¹, Потиевский Э.Г.², Рейс Б.А.², Соколова Т.Ф.², Никонов В.М.¹

Modeling of the acute pyelonephritis in animals of various kind

Lukjanov A.V., Dolgikh V.T., Potievsky E.G., Rais B.A., Sokolova T.F., Nikonov V.M.

¹ Омская государственная медицинская академия, г. Омск

² Центральная научно-исследовательская лаборатория Омской государственной медицинской академии, г. Омск

© Лукьянов А.В., Долгих В.Т., Потиевский Э.Г. и др.

Экспериментальные исследования выполнены на двух видах лабораторных животных: 27 кроликах породы шиншилла в возрасте 3—4 мес с массой тела 1 740—2 290 г ($1\,993,1 \pm 243,2$) и 49 белых беспородных крысах-самцах массой 180—220 г ($195,4 \pm 27,3$). В качестве инфекта использовалась суточная взвесь гемолизирующей *E. coli* с колициногеном Са 38, доза подбиралась эмпирическим путем. Пути введения взвеси *E. coli*: внутривенный, трансуретральный, транкапсулярный в паренхиму почек, энтеральный и эндотрахеальный (у крыс).

При инфицировании животных через различные входные ворота получены три варианта острых инфекций мочевой системы: гнойно-деструктивные и тубулоинтерстициальные поражения, а также бессимптомная бактериурия. Показана высокая вирулентность уроштамма *E. coli*, использованного в данном эксперименте. Сформулирована гипотеза о наличии универсального механизма инфицирования органов мочевой системы — гематогенного.

Ключевые слова: пиелонефрит, моделирование, кролики, крысы.

Experiments have been carried out with two kinds of laboratory animals: 27 rabbits of chinchilla breed with the age of 3—4 months and the weight of the body from 1740 to 2290 grams ($1\,993,1 \pm 243,2$) and 49 white alley male rats with the weight of the body of 180—220 g ($195,4 \pm 27,3$). As an infectious organism, the daily dredge hemolysinogen *E. coli* with colicinogenic factor Са 38 was used. Routes of introduction of dredge *E. coli* were intravenous, transurethral, transcapsular in parenchyma kidneys, enteral and endotracheal (in rats).

As the animals were infected through various entrance gates, three variants of acute infections of the uric system were obtained: purulent-destructive defeats, tubular-interstitial infringements and asymptomatic bacteriuria. High virulence of the urostrain *E. coli*, used in the experiment, is demonstrated. The hypothesis about the universal mechanism of infection of the uric system "from top to down", i.e. hematogenic, has been formulated.

Key words: pyelonephritis, modeling, rabbits, rats.

УДК 616.61-002.3-092.9

Введение

Выполнение экспериментального исследования с позиций биомедицинской этики было обосновано следующими причинами: многие аспекты патогенеза инфекций мочевой системы (ИМС), в том числе острого пиелонефрита, недостаточно изучены и не могут исследоваться в клинике. Неоперационная биопсия органов мочевой системы у больных с острыми инфек-

ционно-воспалительными поражениями в клинической практике не проводится. У больного человека, как правило, не представляется возможным наблюдать развитие инфекционного процесса на всех этапах его формирования.

Традиционно выделяют три возможных пути проникновения и распространения бактерий по мочевой системе: восходящий, гематогенный и лимфогенный. Восходящий, или уриногенный, путь инфицирования

органов мочевой системы считается доминирующим, так как уретра обычно контаминирована бактериями. Инфицированность ее возникает при катетеризации мочевого пузыря, дефектах гигиенического ухода. Размножаясь, бактерии проникают в верхние мочевые пути, достигая почки; этому способствует и наличие пузырно-мочеточникового рефлюкса. Наиболее частым этиологическим фактором здесь обнаруживается *E. coli*. Инфицирование органов мочевой системы представителями нормальной микрофлоры кишечника обусловлено колонизацией промежности (в том числе и препуциального мешка у мальчиков) выделяемыми из фекалий колиформами [13].

Гематогенный путь, т.е. занос бактерий в почки с током крови из инфекционных очагов, возможен при бактериальном эндокардите, центральном венозном катетере, тромбофлебитах. В этих случаях доминируют грамположительные штаммы микроорганизмов или грибы рода *Candida*, реже встречается грамотрицательная микрофлора [12, 13]. Наибольшие споры вызывает лимфогенный путь инфицирования. Если в середине XX в. распространение инфекции из кишечника признавали основным [8], то современные авторы считают лимфогенный путь малозначимым [6, 13].

Совершенно по-новому позволяют посмотреть на проблему ИМС данные, убедительно доказывающие связь инфекций мочевой системы у детей с внутриутробным инфицированием, а развитие пиелонефрита у беременных — как следствие инфицирования органов мочевой системы у девочек [7, 12]. В связи с этим в настоящее время представляется более приемлемым рассматривать механизмы передачи инфекции не по Л.В. Громашевскому [1], а в трактовке Г.П. Ковалевой (1995), которая предложила выделять два механизма передачи инфекции: естественный и искусственный [2]. При этом естественный тип подразделяется на три подтипа: горизонтальный (традиционный, по Л.В. Громашевскому), вертикальный (на разных этапах внутриутробного развития) и заражение во время родов — промежуточный вариант между вертикальным и горизонтальным. Искусственный тип, когда инфицирование происходит при выполнении медицинских манипуляций (эндоскопия, катетеризация, инъекции и т.п.), т.е. применительно к ИМС вариант формирования нозокомиальных (госпитальных) инфекций.

Цель исследования — разработать экспериментальную модель для изучения патогенеза инфекций мочевой системы.

Материал и методы исследования

Экспериментальные исследования проводились в Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) Омской государственной медицинской академии (ОмГМА) (г. Омск) со строгим соблюдением требований Европейской конвенции (Страсбург, 1986) по содержанию, кормлению и уходу за подопытными животными, а также выводу их из эксперимента и последующей утилизации. Хирургические манипуляции осуществлялись под эфирным наркозом.

В эксперименте использовали два вида подопытных животных: 27 кроликов породы шиншилла в возрасте 3—4 мес с массой тела 1 740—2 290 г ($1\,993,1 \pm 243,2$) и 49 белых лабораторных крыс-самцов из питомника ЦНИЛ ОмГМА с массой 180—220 г ($195,4 \pm 27,3$).

Обоснованием для выбора кроликов при проведении экспериментальных исследований послужили следующие аргументы:

- 1) высокая естественная чувствительность к инфекциям;
- 2) возможность получения достаточных объемов крови для одномоментного проведения иммунологических, биохимических и серологических исследований;
- 3) простота повторного прижизненного забора мочи катетером в достаточном количестве для микробиологических и других лабораторных исследований;
- 4) наличие кроличьих люминесцентных сывороток промышленного производства для идентификации *E. coli* в мазках-отпечатках внутренних органов животных;
- 5) необходимость проведения иммунизации животных для получения гипериммунной сыворотки к штамму *E. coli*, использованному при проведении экспериментальных исследований.

Целесообразность выбора второй группы животных — белых лабораторных крыс — была обусловлена следующими факторами:

- 1) высокая естественная устойчивость к инфекциям;
- 2) возможность выполнения острого эксперимента на значительном количестве животных.

В качестве тестовой культуры использовалась суточная взвесь гемолизирующей *E. coli* с колицинтином Са 38 с содержанием микробных тел (МТ) в количестве $5 \cdot 10^9$ в 1 мл, доза подбиралась эмпирическим путем и вводилась в пересчете на 1 кг массы тела. Пути введения взвеси *E. coli* повторяли входные ворота инфицирования, известные в клинической практике: внутривенный, трансуретральный (восходящий), трансапулярный в паренхиму почек, энтеральный и интратрахеальный (у крыс).

Взвесь *E. coli* вводилась кроликам в мочевой пузырь трансуретрально, что потребовало дополнительных гарантий от проводниковой контаминации. Для этой цели была разработана оригинальная модель мочевого катетера [3], позволившая исключить инфицирование мочи животных микроорганизмами из окружающей среды, так как забор проводился в замкнутую систему (шприц). Кроме того, использование данного катетера предупреждало обсеменение животного и окружающей среды высоковирулентным штаммом кишечной палочки, взвесь которой использовалась в эксперименте.

Крысам культура кишечной палочки вливалась через стенку мочевого пузыря под визуальным контролем после предварительной лапаротомии. Распределение животных по группам и дозы инфекта *E. coli* представлены в табл. 1 и 2.

Особенности поставленных задач определили некоторые различия распределения лабораторных кроликов и крыс на группы и кратность инфицирования. Так, у кроликов проведен хронический эксперимент с повторным 5-кратным введением взвеси *E. coli* в мо-

чевой пузырь через уретру (трансуретрально) с интервалом в 3 дня для изучения восходящей (уриногенной) инфекции. В исследованиях с внутрипузырным введением инфекта на лабораторных крысах была поставлена иная задача: определить особенности распространения *E. coli* из нижних мочевых путей с введением 2,5 мл на 1 кг массы тела взвеси кишечной палочки в мочевой пузырь после предварительной перевязки и пересечения мочеточников. Для этого сформировали сопоставимые по численности подгруппы животных: II-а — бактериологические исследования материала выполнялись через 1 ч (6 животных), II-б — через 3 ч (6 животных), II-в — через 24 ч (7 животных).

Для воспроизведения гнойно-деструктивного пиелонефрита использовалась разработанная авторами настоящей статьи, затем модифицированная экспериментальная модель острого гнойного деструктивного (апостематозного) пиелонефрита [11]. Применение суточной взвеси *E. coli* позволило точно дозировать количество инфекта и сделать эксперимент управляемым. Большая численность этой группы животных в сравнении с другими объясняется тем, что наряду с описанными в данной публикации исследованиями отработывался метод оперативного лечения гнойно-деструктивного пиелонефрита, основанный на вмешательстве на капсуле почки без декапсуляции [10].

При энтеральном заражении лабораторных крыс были поставлены две задачи. Во-первых, оценить вирулентность использованного штамма при данных входных воротах, для чего выделялась подгруппа I-а ($n = 5$) —

Таблица 1

Распределение кроликов по группам и доза вводимой взвеси *E. coli*

Группа животных и путь инфицирования	Количество животных	Кратность инфицирования	Доза взвеси <i>E. coli</i> , мл на 1 кг массы тела	
			Разовая	Суммарная
Энтеральный	8	6	1,0	6,0
Внутрипузырный	5	5	0,5	2,5
Трансапулярный	5	1	0,25	0,25
Внутривенный	3	1	1,0	1,0
Контрольная	6	—	—	—

Таблица 2

Распределение крыс по группам и доза вводимой взвеси *E. coli*

Группа животных и путь инфицирования	Количество животных	Кратность инфицирования	Доза взвеси <i>E. coli</i> , мл на 1 кг массы тела	
			Разовая	Суммарная
Энтеральный	11	3	1,0	3,0

Внутрипузырный	19	1	2,5	2,5
Транскапсулярный	9	1	0,5	0,5
Внутривенный	5	1	1,0	1,0
Интратрахеальный	5	1	0,5	0,5

взвесь *E. coli* вводилась трехкратно с интервалом в 30 мин (острый эксперимент). Во-вторых, воссоздать синдром избыточной колонизации кишечника у животных (подгруппа I-б, $n = 6$), для чего проведено трехкратное инфицирование взвесью *E. coli* с перерывом в 3 дня в дозе 1 мл на 1 кг массы тела (хронический эксперимент). У кроликов выполнялся только хронический эксперимент с 6-кратным введением культуры кишечной палочки с промежутком в 3 дня.

Для обнаружения кишечной палочки в биологических жидкостях и внутренних органах использовали бактериологический посев на среду Эндо. После верификации возбудителя проводили биохимическую дифференциацию на многокомпонентной среде Клингера, цитратной среде Симонса, кровяном агаре [4, 5]. Также на среду Эндо делали посев содержимого тонкого (из верхнего, среднего и нижнего отделов) и толстого отделов кишечника после предварительного 10-кратного разведения в стерильной воде.

С целью проведения бактериоскопических исследований с поверхностей срезов внутренних органов (почек, мочевого пузыря, мочеточников, печени, селезенки, легких, костного мозга, лимфатических узлов, слюнных и пузырьковидных желез) делали мазки-отпечатки на предметные стекла. Аналогично обследовали биологические жидкости (кровь, желчь, мочу), которые предварительно центрифугировали. Мазки фиксировали фламбированием. Окраску выполняли карболовым фуксином по методике Пфейффера. Для обнаружения кишечной палочки в гистологических срезах и отпечатках органов мочевой системы использовали реакцию иммунофлюоресценции (РИФ). Предметные стекла с материалом обрабатывались иммунной сывороткой с экспозицией 1 ч. После промывки наносили антиглобулиновую люминесцентную сыворотку с родамином (экспозиция 1 ч).

Патологоанатомический материал для изготовления тонких срезов фиксировали в жидкости Кульчицкого (100 частей 95%-го этилового спирта и 1 часть ледяной уксусной кислоты) и в 10%-м растворе нейтрального формалина. Для обнаружения кишечной палочки в депарафинированных и замороженных сре-

зах проводили окраску карболовым фуксином по способу Циля—Нильсена без докрасивания и с докрасиванием метиленовым синим.

Количественную характеристику клеточного звена иммунитета определяли унифицированным методом подсчета лейкоцитов в счетной камере, морфологическим исследованием форменных элементов крови с дифференциальным подсчетом лейкоцитарной формулы. Поглолительную способность фагоцитов определяли по фагоцитарному числу и фагоцитарному индексу.

У кроликов данный показатель установлен в пределах 20—36%. Активность кислородозависимого метаболизма нейтрофилов исследовали в тесте восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест). Проводились спонтанный и стимулированный варианты теста. Специфические иммунные факторы защиты выявляли в реакции торможения миграции лейкоцитов. Прямую реакцию торможения миграции под слоем агарозы (Clausen) выполняли путем получения суспензии лейкоцитов, реакцией непрямой гемагглютинации, реакцией фотохеомлюминесценции [9].

Результаты и обсуждение

Внутривенное введение подопытным кроликам взвеси *E. coli* Ca 38 сопровождалось развитием клиники тяжелой генерализованной инфекции: животные отказывались от приема пищи и воды, катастрофически быстро истощались, в первые 12 ч развивался паралич задних конечностей. Гибель наступала в течение первых суток. При вскрытии макроскопически определялись множественные гнойные поражения внутренних органов, в том числе и почек. При морфологических исследованиях были выявлены очаги гнойной деструкции в корковом и субкапсулярном пространстве (апостематозный пиелонефрит). При бактериологических, бактериоскопических исследованиях и при иммунолюминесценции было установлено массивное обсеменение почек и других внутренних органов кишечной палочкой, биологические свойства которой совпадали с тестовой культурой. Аналогичные результаты получены в исследованиях на лабораторных крысах. Отличие заключа-

лось в том, что в первые сутки погибли 2 из 5 особей. Неуправляемый характер течения инфекционного процесса послужил основанием для ограничения эксперимента у кроликов на группе в количестве 3 животных. В то же время получен очень важный результат, свидетельствующий о высокой вирулентности взвеси *E. coli* Са 38, использованной в экспериментальных исследованиях.

Неожиданным оказался итог эксперимента с внутривульварным трансуретральным введением взвеси кишечной палочки кроликам. После 5-кратного инфицирования с интервалом в 3 дня изменения слизистой оболочки мочевого пузыря макроскопически не определялись, а при морфологических исследованиях имели место минимальные очаговые проявления катарального цистита. При этом мочеточники во всех случаях были интактными, а в почках определялись умеренные тубулоинтерстициальные нарушения. Бактериологически, бактериоскопически и при иммунолюминесценции установлен факт обсеменения почек тестовой культурой кишечной палочки.

Данное обстоятельство послужило обоснованием для повторения эксперимента на лабораторных крысах, но в модифицированном варианте — введение взвеси кишечной палочки в полость мочевого пузыря производилось после предварительной перевязки и пересечения мочеточников с обеих сторон. Оказалось, что через 1 ч после инфицирования наблюдался умеренный или отсутствовал рост колоний *E. coli* справа, слева — обильный. Через 3 ч асимметрии контаминации уже не было. Через 24 ч прослеживалось обильное обсеменение материала, взятого из обеих почек, кишечника, печени, селезенки, лимфатических узлов.

Наиболее морфологически значимые изменения в интерстиции почек и слизистой оболочки мочевого пузыря получены при 6-кратном энтеральном инфицировании кроликов взвесью. Аналогичные результаты получены при повторении данной экспериментальной модели на белых лабораторных крысах, но после 3-кратного инфицирования с интервалом в 3 дня.

Острая патология респираторного тракта относится к числу самых частых заболеваний как взрослого, так и детского населения и нередко предшествует манифестации ИМС. Указанное обстоятельство послужило основанием для проведения эксперимента по оценке возможности инфицирования органов мочевой системы из инфекционного очага в дыхательных путях. С этой целью лабораторным крысам интратрахеально однократно вводилась стандартная взвесь кишечной палочки из расчета 0,5 мл на 1 кг массы тела. Спустя 3 ч был получен обильный рост кишечной палочки из материала, взятого в обеих почках, кишечнике, лимфатических узлах.

По ходу эксперимента была проведена оценка общего содержания лейкоцитов в периферической крови, состояния фагоцитарной активности нейтрофилов и сенсибилизации Т-лимфоцитов в динамике развития инфекционного процесса у животных с тубулоинтерстициальным нефритом (в динамике развития процесса), апостематозным пиелонефритом и в контрольной группе. Однократное изучение группы животных с апостематозным пиелонефритом объяснялось необходимостью вывода их из эксперимента для проведения морфологических исследований. Результаты этих исследований свидетельствуют об адекватном реагировании иммунной системы животных на воспалительный процесс, а степень сдвигов показателей зависит от его тяжести (табл. 3).

Таблица 3

Влияние инфекционного процесса в почках у кроликов на показатели иммунной системы ($M \pm m$)

Изучаемый показатель	Группа кроликов	Срок исследования, сут		
		4-е	9-е	14-е
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	I	$7,05 \pm 0,11^*$	$8,60 \pm 0,08^*$	$6,55 \pm 0,06$
	II	$7,95 \pm 0,09^*$	—	—
	III	$5,59 \pm 0,07$	—	—
Фагоцитарное число	I	$7,10 \pm 0,06^*$	$4,40 \pm 0,03$	$2,40 \pm 0,05$
	II	$7,90 \pm 0,07^{**}$	—	—
	III	$5,10 \pm 0,02$	—	—
Фагоцитарный индекс	I	$35,70 \pm 1,80^*$	$74,50 \pm 2,20^{***}$	$64,07 \pm 2,70^{***}$
	II	$73,30 \pm 2,40^{***}$	—	—
	III	$28,30 \pm 2,10$	—	—
НСТ-тест спонтанный	I	$22,80 \pm 6,10$	$23,70 \pm 4,90$	$14,10 \pm 6,70$

	II	19,60 ± 4,70	—	—
	III	20,40 ± 3,60	—	—
	I	37,20 ± 4,30	48,40 ± 5,20	48,50 ± 5,70
НСТ-тест стимулированный	II	35,20 ± 6,80	—	—
	III	41,40 ± 3,80	—	—
	I	–25,95 ± 2,60**	–9,73 ± 2,80*	–6,37 ± 1,50
Реакция торможения миграции лейкоцитов	II	–58,37 ± 2,40***	—	—
	III	–4,25 ± 0,03	—	—
	I	—	—	—

Примечание. Группа I — животные с тубулоинтерстициальным нефритом (n = 12), II — с гнойно-деструктивным пиелонефритом (n = 7), III — контрольная (n = 6). Достоверность различий: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ по отношению к контролю.

Заключение

При инфицировании животных через различные входные ворота получено три варианта острых инфекций мочевой системы: гнойно-деструктивный пиелонефрит, тубулоинтерстициальные нарушения и бессимптомная бактериурия. Доказана высокая вирулентность уроштамма *E. coli*, использованного в данном исследовании, как по культуральным свойствам, так и в биологических пробах. Вероятно, существует универсальный механизм инфицирования органов мочевой системы «сверху вниз», т.е. гематогенный.

Литература

1. Громашевский Л.В. Общая эпидемиология. М.: Медицина, 1965. 290 с.
2. Ковалева Г.П. О механизме передачи инфекций в свете новых данных // Журн. микробиологии. 1995. № 1. С. 103—106.
3. Лукьянов А.В., Никонов В.М., Рейс Б.А., Бугаев Я.В. Катетер для забора мочи // Бюл. Федер. ин-та промышл. собственности. 2001. № 4. С. 350.
4. Меньшиков В.В., Долекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. М.: Медицина, 1987. 368 с.
5. Методические лабораторные технологии: Справочник. В 2 т. / Под ред. А.И. Карпищенко. СПб.: Интермедика, 1999.
6. Папаян А.В., Аничкова И.В., Кошелева Л.Н. и др. Микро-воспалительные заболевания органов мочевой системы // Клиническая нефрология детского возраста. СПб.: SOTIS, 1997. С. 450—501.
7. Прозоровский С.В., Раковская И.В., Вульфович Ю.В. Медицинская микоплазмология. М.: Медицина, 1995. 288 с.
8. Пытель А.Я., Голигорский С.Д. Пиелонефрит. М.: Медгиз, 1961. 262 с.
9. Редькин Ю.В., Горячев А.Н., Соколова Т.Ф. Схема комплексного иммунологического обследования больных в сочетании с сочетанными и множественными повреждениями в специализированных лечебных учреждениях: Методические рекомендации. Омск: ОГМИ, 1988. 27 с.
10. Ситко Л.А., Рейс Б.А., Никонов В.М., Лукьянов А.В. Способ лечения острого пиелонефрита // Бюл. Федер. ин-та промышл. собственности. 2003. № 6 (II ч.). С. 212.
11. Ситко Л.А., Рейс Б.А., Никонов В.М., Лукьянов А.В. Способ моделирования острого гнойного пиелонефрита // Бюл. Федер. ин-та промышл. собственности. 2002. № 24 (II ч.). С. 369.
12. Цинзерлинг А.В., Вуду Г.А. Внутритрурный микоплазмоз. Кишинев: Штиница, 1986. 189 с.
13. Johnson C.E. New advances in childhood urinary infection // Pediatrics in Review. 1999. № 10. P. 10.

Поступила в редакцию 21.01.2005 г.