

**В.Л. Лимонов, А.В. Шурлыгина, М.В. Робинсон, Н.Г. Пантелеева,
О.П. Колесникова, С.В. Айдагулова, Г.И. Непомнящих, В.А. Труфакин**

МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЧЕК И СЕЛЕЗЕНКИ У МЫШЕЙ С ИММУНОКОМПЛЕКСНЫМ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ, ИНТАКТНЫХ И НА ФОНЕ ИММУНОСУПРЕССИВНОЙ ТЕРАПИИ

ГУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН,
ГУ НИИ физиологии СО РАМН,
ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН,
ГУ НИИ региональной патологии и патоморфологии СО РАМН, Новосибирск

Проведено изучение морфологической картины почек и селезенки мышей с экспериментальной моделью аутоиммунного заболевания (иммунокомплексный гломерулонефрит) на фоне иммуносупрессивной терапии соединением ВЛ-11-02 (производное индолилтиоалканкарбоновой кислоты) в сравнении с традиционно применяемым для лечения аутоиммунных заболеваний препаратом азатиоприн. Обнаружено, что у животных, получавших иммуносупрессивную терапию, независимо от использованного препарата снижается протеинурия, уменьшаются патоморфологические проявления почечной патологии и активации селезенки. Сделано заключение, что соединение ВЛ-11-02 по своей эффективности не уступает препарату сравнения (азатиоприну), а по некоторым параметрам превосходит его.

Ключевые слова: индолилтиоалканкарбоновая кислота, иммунокомплексный гломерулонефрит, почка, селезенка, иммуносупрессия

Имунокомплексный гломерулонефрит является моделью аутоиммунного заболевания, при котором поражение почек обусловлено иммунологическими механизмами [1]. Иммунологическим механизмом, запускающим каскад нарушений в почках, является Т-зависимая поликлональная активация В-клеток, сопровождающаяся увеличением синтеза анти-ДНК антител, формированием иммунных комплексов, что приводит к системному иммунокомплексному воспалительному процессу в почках — нефриту и протеинурии. Такой тип повреждения почек сравним морфологически и функционально с характером поражения почек при СКВ [2, 3].

В лечении аутоиммунных заболеваний человека широко применяются иммунодепрессанты (азатиоприн, глюкокортикоиды), которые оказывают цитостатическое действие на иммунокомпетентные клетки и тем самым снижают выраженность аутоагрессии. Однако многие из препаратов этого класса обладают либо значительными побочными эффектами (глюкокортикоиды), либо высокой токсичностью (азатиоприн). Это ограничивает возможности их применения в клинике и заставляет искать новые средства иммунокоррекции заболеваний аутоиммунного генеза.

В предварительных экспериментах установлено, что синтетическое производное индолилтиоалканкарбоновой кислоты (соединение ВЛ-11-02)

обладает выраженными миело- и иммунодепрессивными свойствами и значительно меньшей токсичностью, чем традиционно используемые иммунодепрессанты. Целью настоящего исследования явилось изучение иммунокорректирующего эффекта данного вещества на экспериментальной модели аутоиммунной патологии в сравнении с традиционно применяемым для лечения аутоиммунных заболеваний препаратом азатиоприн.

Материал и методы

В работе использовали здоровых половозрелых животных — мышей линии DBA/2 и мышей гибридов (C57BL/6хDBA/2)F1 (BDF1), самок 8-10 недельного возраста, массой тела 18-20 г. Разброс в группах по исходной массе тела не превышал $\pm 10\%$. Контрольные и опытные животные были одного возраста и получены одновременно из одного питомника («Рассвет», г. Томск). До и в период эксперимента контрольные и подопытные животные содержались в виварии в одинаковых условиях: стандартных пластиковых клетках с мелкой древесной стружкой (не более 10 особей) на стандартном рационе. Все исследования проводили в одно и то же время суток (утром). Все эксперименты выполнены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Минздрава СССР от 12.08.77 г.).

Модель иммунокомплексного гломеруло-

нефрита вызывали у самок BDF1 двукратным с недельным интервалом внутривенным введением лимфоидных клеток от самок родительской линии DBA/2. Содержание белка в моче определяли калориметрически с красителем Kumsai brilliant blue (Loba Feinchemie) на Titertec Multiscan, длина волны λ 570 nm. В опытах использовали мышей со стойкой протеинурией и содержанием белка 3 мг/мл и более (белок в моче определялся неоднократно). Физиологическая протеинурия составляет у мышей от 0 до 1,0 мг/мл

Для изучения иммуносупрессорных свойств соединения ВЛ-11-02 проведено 2 серии опытов. В I серии у мышей со стабильной протеинурией на протяжении 2-х месяцев и содержанием белка в моче от 3,0 до 6,5 мг/мл проведено курсовое введение соединения ВЛ-11-02. Курс составил 10 ежедневных внутрижелудочных введений через зонд соединения в дозе 5 мг/кг (100 мкг/мышь) и 10 мг/кг (200 мкг/мышь). Аналогичным образом вводили препарат сравнения азатиоприн в дозе 5 мг/кг. Измерение протеинурии проводили через сутки после последнего введения препаратов.

Для гистологического исследования селезенки и почек мышей забивали под эфирным наркозом через сутки после последнего введения препаратов и извлекали соответствующие органы. Контролем служили животные, которым моделировали иммунокомплексный гломерулонефрит, но не применяли медикаментозного воздействия. Селезенку фиксировали в жидкости Телесницкого и заливали в парафин. На ротационном микротоме приготавливали срезы толщиной 5-7 мк. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином по общепринятой методике. Морфометрическое исследование проводили на комплексе AxioPlan-2 (Karl Zeiss) по программе Axiovision при увеличении ок.10, об.10. В срезах измеряли площади фолликулов белой пульпы, реактивных центров и периартериальных зон, вычисляли размеры В-зависимых зон белой пульпы (общая площадь фолликула — площадь периартериальной зоны) и соотношение Т- и В-зависимых зон (площадь периартериальной зоны/площадь В-зависимой зоны). Для каждой мыши проводили по 10 измерений (для тимуса и для селезенки) в произвольно выбранных срезах из разных отделов органов. Кроме того, под световым микроскопом при том же увеличении подсчитывали количество фолликулов белой пульпы с реактивными центрами и без реактивных центров. Образцы почек фиксировали в 4% параформальдегиде, приготовленном на фосфатном буфере Миллонига; затем материал проводили для заливки в парафин и в эпоксидные смолы. Парафиновые срезы окрашивали гематок-

силином и эозином в сочетании в реакцией Перлса (на выявление ионов железа), по ван Гизону с докраской эластических волокон резорцин-фуксином Вейгерта, ставили ШИК-реакцию. Полутонкие срезы окрашивали реактивом Шиффа и азуром II. Результаты статистически обработаны с использованием пакета прикладных программ для ПК STATISTICA 5. Достоверность различий показателей экспериментальных групп оценивали по критерию U Манна-Уитни при 95% уровне значимости.

Результаты и обсуждение

Мыши с экспериментальным иммунокомплексным гломерулонефритом характеризуются выраженной протеинурией (уровень белка в моче составляет в среднем 8,47 мг/мл), что свидетельствует о нарушении фильтрационной функции почечных клубочков. Введение соединения ВЛ-11-02 в разных дозах в 80% случаев привело к снижению белка в моче. При введении азатиоприна в I серии опытов протеинурия снижалась у 40% животных, а во II — у 83%. Можно сказать, что в целом по эффективности соединение не уступает широко используемому в клинической практике иммунодепрессанту азатиоприну, а в некоторых случаях и превосходит его.

Патоморфологическое исследование почек дало следующие результаты. В препаратах почек мышей контрольной группы (нелеченные) в большинстве клубочков наблюдаются изменения, касающиеся всех их компонентов — уменьшение диаметра, редукция просветов капиллярных петель и мочевых пространств, адгезия и очаговые синехии боуеновой капсулы. Местами прослеживается гиперплазия капсулярного эпителия. Просветы сосудистых петель неравномерно, но значительно расширены, со стазом эритроцитов. Гломерулярные базальные мембраны резко утолщены, ШИК-позитивны, сегментарно отмечен феномен «проволочных петель» — десквамация эндотелиальной и эпителиальной составляющих гломерулярного фильтра. Пролиферация мезангиоцитов отсутствует. Почечные канальцы в состоянии дистрофии. Эпителий многих проксимальных канальцев с многочисленными крупными железосодержащими гранулами, характеризующимися положительной реакцией Перлса. Во всех случаях в просветах канальцев выявлены многочисленные крупные белковые цилиндры. Часть канальцев с признаками выраженной тотальной альтерации и десквамации тубулярного эпителия. В интерстиции полнокровие сосудов, в мозговом слое — лимфостаз, выражена интенсивная периваскулярная, перитубулярная и перигломерулярная моноклеарная лимфомакрофагальная инфильтрация. В строме отмечены

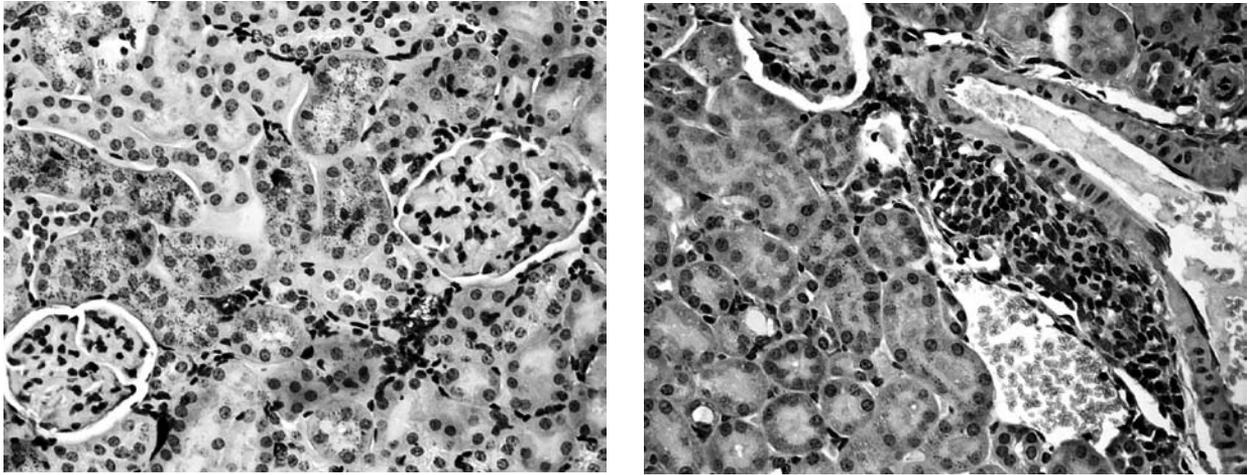


Рис. 1. Структурные изменения почек при экспериментальном иммунокомплексном гломерулонефрите. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 250.
а — многочисленные гранулы гемосидерина в эпителиоцитах канальцев, сидерофаги в интерстиции, коллапс гломерулярных капилляров; б — периваскулярная мононуклеарная инфильтрация.

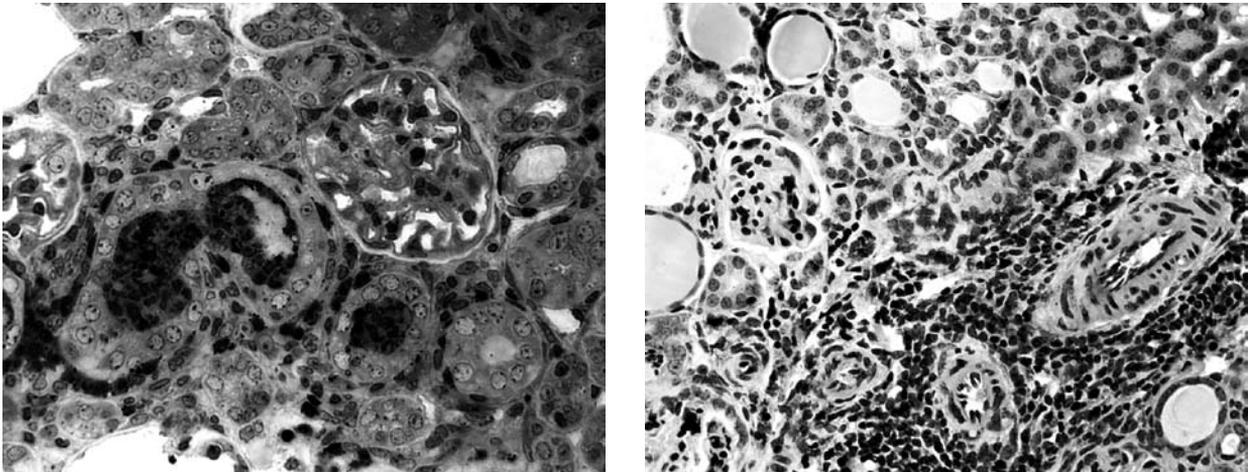


Рис. 2. Структурные изменения почек при коррекции экспериментального иммунокомплексного гломерулонефрита азатиоприном.
а — утолщение гломерулярных базальных мембран, расширение зон мезангия, клеточный детрит в просветах канальцев. Полутолкий срез, окраска азуром II. Ув. 400; б — значительная периваскулярная мононуклеарная инфильтрация, белковые цилиндры в просветах канальцев, атрофия клубочка. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 250.

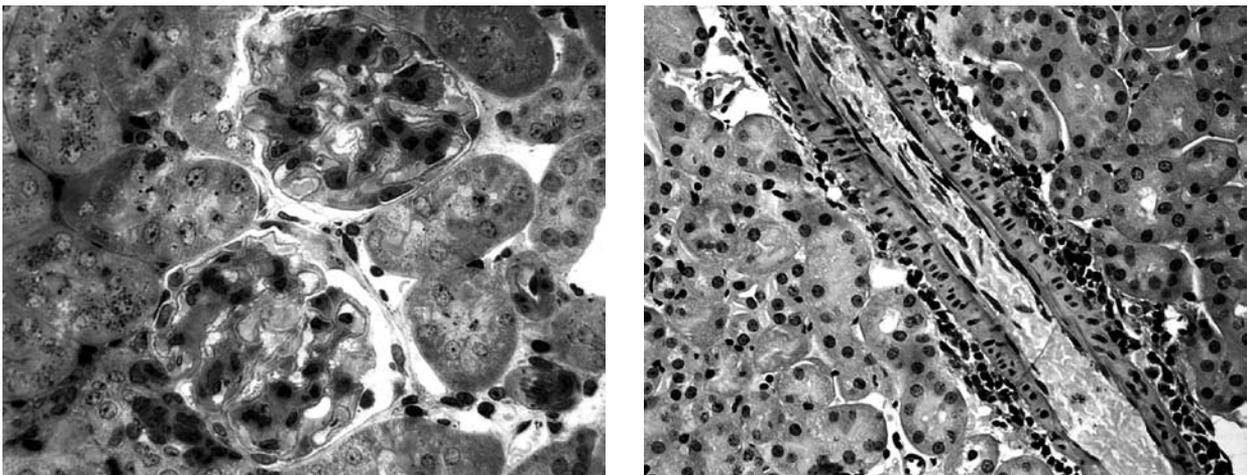


Рис. 3. Структурные изменения почек при коррекции экспериментального иммунокомплексного гломерулонефрита соединением ВЛ-11-02.
а — очаговое увеличение зон мезангия без признаков гиперплазии мезангиоцитов, гипертрофия эндотелиоцитов гломерулярных капилляров. Полутолкий срез, окраска азуром II. Ув. 400; б — минимальная периваскулярная мононуклеарная инфильтрация, отсутствие гранул гемосидерина в эпителии канальцев. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 250.

значительные скопления гранул гемосидерина (Рис. 1).

У животных, леченных азатиоприном, в меньшей степени выражены структурные изменения гломерулярного и тубуло-интерстициального компартментов почек. В меньшей степени выражен и распространен феномен «проволочных петель», и более заметна пролиферация эндотелиоцитов. В почечных канальцах единичные мелкие белковые цилиндры. Мононуклеарная клеточная инфильтрация, представленная преимущественно лимфоцитами, выражена в меньшей степени и в основном приурочена к крупным артериям, встречаются мелкие перитубулярные и перигломерулярные лимфоидные инфильтраты. Отложения гемосидерина в интерстиции, в отличие от контрольной группы, имеют не диффузный, а очаговый характер (Рис. 2).

У мышей, получавших соединение ВЛ-11-02, почечные клубочки во всех случаях характеризовались умеренно выраженным полиморфизмом — от близкой к нормальной структуры до измененной. Как правило, гломерулярные сосудистые петли неравномерно расширены и полнокровны, с различной степенью адгезии сосудистого пучка к боуеновой капсуле, с очаговым увеличением зон мезангия, но также без признаков гиперплазии мезангиоцитов. Гломерулярные базальные мембраны неравномерно утолщены, с минимальными сегментарными изменениями по типу «проволочных петель». Эндотелий и подоциты умеренно полиморфны. В почечных канальцах небольшое количество гранул гемосидерина. Эпителиальная базальная мембрана канальцев ШИК-позитивна, цилиндры не обнаружены. Клеточная инфильтрация минимальна или отсутствует, носит преимущественно лимфоцитарный характер, приурочена к единичным гломерулам, мелким сосудам и еще реже — канальцам. Одиночные гранулы гемосидерина в интерстиции обнаружены в одном случае (Рис. 3).

Таким образом, животные с экспериментальным иммунокомплексным гломерулонефритом характеризуются поражением всех компартментов почек. Применение азатиоприна, и соединения ВЛ-11-02 приводит к уменьшению выраженности структурных изменений гломерул, тубулярной альтерации, интерстициального гемосидероза, а также мононуклеарной инфильтрации. Применение соединения ВЛ-11-02 по сравнению с азатиоприном приводит к максимальному уменьшению мононуклеарной клеточной инфильтрации, исчезновению геморрагического синдрома и появлению тенденции к регенерации эндотелиоцитов капилляров клубочков.

Исследование селезенки показало, что у животных, получавших азатиоприн, и соединение ВЛ-11-02, снижается весовой индекс органа, процент фолликулов белой пульпы с реактивными центрами и повышается процент фолликулов, не имеющих реактивных центров. Размеры реактивных центров уменьшаются при обоих видах воздействия. Размеры периартериальных муфт (Т-зависимые зоны) имеют тенденцию к снижению. В группе, получавшей азатиоприн, средняя площадь этих структур оказалась достоверно меньше, чем у мышей, которым вводили соединение ВЛ-11-02 (таблица 1). Таким образом, и цитостатик (азатиоприн), и исследуемое соединение снижают активацию селезенки при экспериментальном аутоиммунном процессе. Вероятно, иммуносупрессия обуславливает уменьшение морфофункциональных нарушений в почках, в патогенезе которых ведущую роль играют иммунологические механизмы [1]. При этом соединение ВЛ-11-02 оказывает меньшее по сравнению с азатиоприном влияние на Т-зависимые зоны селезенки, что, возможно, связано с его меньшей токсичностью.

Заключение

Соединение ВЛ-11-02 проявляет иммуносупрессивные свойства в модели иммунокомплекс-

Таблица
Влияние азатиоприна и соединения ВЛ-11-02 на морфометрические параметры селезенки мышей с иммунокомплексным гломерулонефритом

| Параметр | Контроль (M±m) | Азатиоприн (M±m) | Соединение ВЛ-11-02 (M±m) |
|--|----------------|------------------|---------------------------|
| Весовой индекс | 7,98±1,87 | 3,79±0,43* | 4,07±0,59* |
| Фолликулы с реактивными центрами (%) | 68,18±7,4 | 16,16±2,19* | 17,31±3,01* |
| Фолликулы без реактивных центров (%) | 31,82±7,4 | 83,84±2,19* | 82,69±3,01* |
| Площадь фолликулов (мкм ² ×10 ³) | 82,12±8,31 | 87,52±4,66 | 74,54±3,47 |
| Площадь реактивных центров (мкм ² ×10 ³) | 20,2±2,60 | 14,26±13,03* | 12,01±1,16* |
| Площадь периартериальных муфт (мкм ² ×10 ³) | 17,14±6,97 | 10,65±2,06 | 15,91±3,26# |

Примечание: * — отличия от группы «контроль» достоверны при p<0,05; # — отличия от группы «азатиоприн» достоверны при p<0,05.

ного гломерулонефрита, который по своему патогенезу и клиническим проявлениям во многом аналогичен такой аутоиммунной патологии, как системная красная волчанка. Применение данного вещества уменьшает патологические проявления в почках и снижает активацию иммунной системы преимущественно на уровне В-клеточного звена. В целом по эффективности соединение не уступает широко используемому в клинической практике иммунодепрессанту азатиоприну, а в некоторых отношениях превосходит его.

The use of the derivative of indolylthiocarbonyl acid (compound VL-11-02) as immunocorrector with the help of immunocomplex glomerulo-nephritis model

V.L. Limonov, A.V. Shurlygina, M.V. Robinson, N.G. Panteleeva, O.P. Kolesnikova, S.V. Aidagulova, G.I. Nepomniashih, V.A. Trufakin

Immunocorrective effect of the derivative of indolylthiocarbonyl acid (compound VL-11-02) which has myelo- and immunodepressive properties has been investigated in mice' kidney and spleen with

the experimental model of autoimmune pathology (as compared to traditional immunodepressant azathioprine). It has been found that azathioprine and compound VL-11-02 decreased proteinuria and pathomorphological features of renal pathology and spleen activation. It has been concluded that the efficacy of the compound VL-11-02 does not yield to azathioprine and surpasses it in some parameters.

Литература

1. Показатели эритро- и иммунопоэза в развитии аутоиммунных заболеваний, индуцированных хронической реакцией трансплантат против хозяина / О.П. Колесникова, О.Т. Кудаева, В.А. Логинов и др. // Вестн. АМН СССР. — 1991. — № 12. — С. 13-16.

2. *Appleby P.* Murine chronic graft-versus-host disease as model of systemic lupus erythematosus: effect of immunosuppressive drugs on disease development / P. Appleby, D.G. Webber, J.G. Bowen // Clin. and Exp. Immunol. — 1989. — Vol. 78. — № 3. — P. 449-453.

3. *Kimura M.* Depressed antibody responses to exogenous antigens in mice with lupus-like graft-versus-host diseases / M. Kimura, E. Gleichmann // Clin. Immunol. and Immunopathol. — 1987. — Vol. 43. — № 1. — P. 97-109.