

АРГИНИН КАК ФАКТОР НЕБЛАГОПРИЯТНОГО ТЕЧЕНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НА ЖИВОТНЫХ С РАЗЛИЧНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ К ТУБЕРКУЛЕЗУ)

Сабадаш Е. В.^{1,2}, Скорняков С. Н.^{1,2}, Павлов В. А.¹, Новиков Б. И.¹

¹ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России; ²ФГБОУ «Уральский государственный медицинский университет», Екатеринбург, Россия

На модели экспериментального туберкулеза морских свинок изучить влияние аминокислоты аргинин на течение туберкулезного процесса. Опыты проведены на 75 морских свинок и 25 крысах (массой 200-250 г.). Для воспроизведения экспериментального туберкулеза использовали музейный штамм микобактерий центрального НИИ туберкулеза H37Rv, 1993. Группы животных: 3 группы морских свинок по 25 шт. (здоровый контроль, зараженные МБТ и зараженные МБТ, получающие аргинин ежедневно 10 мг/кг массы тела животного в течение месяца) и 2 группы крыс по 25 штук (здоровый контроль и зараженные МБТ). Определяли в крови нитриты и нитраты, суммарные перекиси липидов методом ИФА Biomedica GRUPPE и R & D Systems. **Результаты.** У животных, не обладающих резистентностью к туберкулезной инфекции, повышенное содержание в плазме производных оксида азота, вызванных применением аргинина является неблагоприятным фактором, способствующим прогрессированию туберкулеза.

Ключевые слова: туберкулез, морские свинки, крысы, аргинин, лейкоциты крови, оксид азота

Введение. Одним из факторов, влияющих на течение специфического воспалительного процесса, является оксид азота, уровень производных которого в плазме и нейтрофилах больных туберкулезом – нитритов и нитратов снижается параллельно тяжести процесса. При этом, при переходе очаговой формы туберкулеза легких в инфильтративную, количество нитрита может повышаться, но в терминальной стадии болезни, напротив, наблюдается его снижение [1,2]. Описано прямое бактерицидное действие метаболитов оксида азота при туберкулезе, связанное с повреждающим действием на ДНК микобактерий туберкулеза [3]. Напротив, Л. В. Сахно и соавт. [4] на основании полученных в экспериментах *in vitro* данных пришли к заключению, что спонтанная и стимулированная генерация оксида азота в мононуклеарах крови при активном туберкулезе может становиться чрезмерной, и участвовать при этом в апоптозе иммунокомпетентных клеток и развитии специфической аллергии. Вместе с тем, существуют данные о том, что лекарственная устойчивость

МБТ связана с их резистентностью к оксиду азота [1,5]. В организме человека синтез оксида азота клетками осуществляется из аминокислоты L-аргинина. По данным литературы [1,6,7] оксид азота играет существенную роль в инвазии, репликации и поддержании латентного состояния внутриклеточных инфекций, в том числе и МБТ. Он может с одной стороны, вызывать гибель патогенов и индуцировать процессы апоптотической гибели клеток хозяев, а с другой, участвует в подавлении иммунных реакций, защищая «бактерии от хозяина» [8,9]. Таким образом, применение аргинина на фоне туберкулезного процесса, на наш взгляд, могло бы изменить течение последнего. Для уточнения правильности наших выводов на клиническом материале мы провели экспериментальные исследования на животных с различной чувствительностью к туберкулезу.

Цель исследования – изучение влияния аминокислоты аргинин на течение туберкулезного процесса, на модели экспериментального туберкулеза морских свинок и крыс.

Материалы и методы. Проведены экспериментальные исследования на животных с высокой естественной резистентностью к МБТ – крысах и низкой – морских свинок с целью изучения влияния активных форм азота и аминокислоты аргинин на течение туберкулезного процесса. Для создания экспериментальной модели туберкулеза использовали музейный штамм микобактерий H37Rv 1993 г. В исследовании использовано 3 группы морских свинок по 25 штук (здоровый контроль, зараженные МБТ и зараженные МБТ, получающие аргинин) и 2 группы крыс по 25 штук (здоровый контроль, зараженные МБТ). Масса животных составила 200-250 гр., возраст 2 месяца. Аргинин использовался ежедневно в дозе 10 мг на кг массы тела животного в течение 1 месяца. Лечение начиналось через 2 недели после заражения. Макроскопическую оценку изменений внутренних органов проводили путем определения индекса поражения по четырехбалльной шкале, где 1 балл – минимальные изменения, 4 балла – максимальные. Определение в крови конечных продуктов метаболизма оксида азота – нитрита и нитрата осуществляли методом иммуноферментного анализа.

Результаты и обсуждение. На момент завершения эксперимента у всех зараженных морских свинок развивался генерализованный туберкулез с преимущественным поражением селезенки, печени, лимфоузлов, легких. У крыс, несмотря на то, что доза заражения была в 100 раз большей, туберкулезный процесс не развивался. Установлено, что фагоцитарная активность лейкоцитов крови у морских свинок после заражения МБТ статистически значимо снижается как по числу фагоцитирующих клеток так и по числу поглощенных бактерий примерно на 10-15% ($p < 0,05$). Метаболическая активность по НСТ тесту так же подавлена примерно на 25% ($p < 0,05$). У крыс после заражения такого угнетения фагоцитоза как у морских свинок не наблюдается. Показатели остаются примерно на том же уровне что и в контроле. При этом у крыс показатели генерации АФК в лейкоцитах (в НСТ-тесте) возрастают на базальном уровне (примерно на 20% $p < 0,05$), тогда как при стимуляции продигозаном этого не наблюдается. И даже напротив коэффициент стимуляции несколько снижен по отношению к контролю. Подчеркнем, что у всех исследуемых животных

снижаются показатели индекса стимуляции метаболической активности фагоцитов крови после введения им культуры МБТ H 37Rv (морские свинки, крысы). То есть МБТ даже у устойчивых к ним крыс действуют угнетающе на фагоциты.

Установлено, что у животных с различной видовой устойчивостью к МБТ генерация ВСА в организме в ответ на заражение музейным штаммом МБТ H37rv значительно отличается. Так у морских свинок количество конечного продукта окисления ВСА – нитрата в плазме крови возрастает после заражения от $56, \pm 11,2$ в контроле до $88,8 \pm 10,5$ мкм/л, то есть примерно в 1,6 раза ($p < 0,01$ к контролю). Тогда как у крыс достоверного увеличения этого вещества к контролю не наблюдается ($26,14-31,9$ мкм/л соответственно). Следует отметить, что морские свинки располагают вообще большими ресурсами ВСА, так в контроле содержание нитрата в плазме более чем в 2 раза превосходит таковое у крыс. У морских свинок так же гораздо более высокие показатели суммарных перекисей липидов определяемых по оксистату. Так содержание оксистата в крови у здоровых морских свинок $394,46 \pm 54,8$ мкм/л, а у зараженных – $609,53 \pm 143,40$. У крыс его содержание $145,4 \pm 31,6-163,8 \pm 18,8$ мкм/л соответственно.

Таким образом, после заражения МБТ у крыс увеличения показателей оксистата практически не наблюдается, а у морских свинок его уровень резко возрастает. Нитрат является конечным метаболитом ВСА генерируемых эндотелием, фагоцитами, а оксиген – конечным метаболитом превращения свободных радикалов кислорода – АФК. Поэтому динамика уровня нитрата и оксигена в крови является неким интегральным показателем способности организма генерировать ВСА и АФК.

В контрольной группе животных исходный уровень нитрата плазмы крови составил $56,3 \pm 5,4$ мкмоль/л. В опытной группе, не получавшей лечение уровень нитрата составил $88,8 \pm 3,2$ мкмоль/л, а в группе, получавшей аргинин – $250,6 \pm 57,9$ мкмоль/л. В группе животных, получавших аргинин туберкулезный процесс протекал существенно тяжелее, а макроскопическая оценка изменения внутренних органов составила 4 балла в сравнении с 2-3 баллами в опытной группе, не получавшей аргинин.

Выводы:

1. Видовая устойчивость животных к МБТ сопряжена с генерацией АФК и ВСА в ответ на заражение. Их количество больше у морских свинок, чем у крыс.

2. У животных, не обладающих резистентностью к туберкулезной инфекции, повышенное содержание в плазме производных оксида азота, вызванных применением аргинина является неблагоприятным фактором, способствующим прогрессированию туберкулезного процесса. При этом угнетается фагоцитарная активность лейкоцитов крови.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каминская Г.О. Оксид азота – его биологическая роль и участие в патологии органов дыхания //Пробл. туб. и болезней легких.–2004.– № 6.– С.–3-11. Kaminskaya G. O. Oksid azota – ego biologicheskaya rol' i uchastie v patologii organov dyhaniya //Probl. tub. i boleznej legkih.–2004.– № 6.– С.–3-11.
2. Guerra C. Control of Mycobacterium tuberculosis growth by glutathione danced natural killer cells. Clin.ande.Immun. 2012;168(1):148-152
3. FarniaP., MohammadF., TabatabaiD.J., MasjediM.R. //J. Tubercle. LungDis.– 1998; – Vol. 2 N 11.– Suppl. 2.– P. 396-397
4. Сахно Л.В., Хонина Н.А., Норкина О.В., Мостовая Г.В., Никонов С.Д., ОгиренкоА.П., Черных Е.Р., Останин А.А. Участие оксида азота в развитии туберкулезной анергии у больных туберкулезом легких //Пробл.туб.– 2001.– № 8.– С. 42-46. Sahno L.V., Honina N.A., Norkina O.V., Mostovaya G. V., Nikonov S. D., Ogirenko A. P., Chernyh E. R., Ostanin A. A. Uchastie oksida azota v razvitii tuberkuleznoj anergii u bol'nyh tuberkulezom legkih //Probl.tub.– 2001.– № 8.– S.42-46.
5. Проскуряков С.Я., Бикетов С.И., Иванников А.И., Скворцов В.Г.. Оксид азота в механизмах патогенеза внутриклеточных инфекций // Иммунология.– 2000.–№ 4.– С. 49-55. Proskuryakov S. Ya., Biketov S. I., Ivannikov A. I., Skvorcov V. G.. Oksid azota v mekhanizmah patogeneza vnutrikletochnyh infekcij // Immunologiya.– 2000.–№ 4.– S. 49-55.
7. Сиренко И. А., Шматько С. А. Особенности L-аргининзависимого синтеза оксида азота у детей и подростков, больных туберкулезом органов дыхания Украинський пульмонологічний журнал. 2006, № 1.– С. 63-65. Sirenko I. A., Shmat'ko S. A. Osobennosti L-argininzavisimogo sinteza oksida azota u detej i podrostkov, bol'nyh tuberkulezom organov dyhaniya Ukrain's'kij pul'monologichnij zhurnal. 2006, № 1.– S. 63-65.
8. Stephen St. John, R. Blower, Taissia G. Popova, Earthy Narayanan, Myung-Chul Chung, Charles L. Bailey and Sergei G. Popov. Bacillus anthracisopts nitric oxide and host serum albumin for pathogen city in hypoxic conditions. 2013 Vol 3.
9. Olin to S.C.F. Arginine induces GH gene expression dye activating NOS/NO signaling in rat isolated hemi- pituitaries. Braz. J. Med. Biol. Res. 2012; 45(11):1066-1073.

THE IMPACT OF THE AMINO ACID ARGININE ON THE COURSE OF EXPERIMENTAL TUBERCULOUS PROCESS IN ANIMALS WITH DIFFERENT SENSITIVITY TO TUBERCULOSIS

Sabadash E. V., Skornyakov S. N., Pavlov V. A., Novikov B. I.

The FGBI "Ural research Institute of Phthisiopulmonology, Ministry of healthcare of the Russian Federation; FGBOU USMU, Ekaterinburg, Russia

On the model of experimental tuberculosis of guinea pigs to study the effect of amino acid arginine on the course of the tuberculosis process. Experiments were carried out on 75 guinea pigs and 25 rats (weighing 200-250 g). To reproduce experimental tuberculosis, a museum strain of mycobacteria was used at the Central Research Institute of Tuberculosis H37Rv, 1993. Groups of animals: 3 groups of guinea pigs of 25 pcs. (Healthy control, infected with ILW and infected with ILT, receiving arginine daily 10 mg / kg body weight of the animal for a month) and 2 groups of rats of 25 pieces (healthy control, infected with ILW and infected with MBT). Determined in the blood nitrites and nitrates, total lipid peroxides by ELISA Biomedica GRUPPE and R & D Systems. Results. In animals lacking resistance to tuberculosis infection, increased plasma levels of nitric oxide derivatives caused by the use of arginine is an unfavorable factor contributing to the progression of tuberculosis.

Key words: tuberculosis, guinea pigs, rats, arginine, blood leukocytes, nitric oxide