

УДК 616.9-092.9:57.084.1

**ФУНКЦИОНАЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ В МЕЖВИДОВОЙ УСТОЙЧИВОСТИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ К ТУБЕРКУЛЕЗУ****¹Павлов В.А., ^{1,2}Котомцев В.В., ¹Медвинский И.Д., ¹Сабадаш Е.В.,
¹Ершова А.В., ¹Кравченко М.А.**¹ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии Минздрава РФ»,
Екатеринбург, e-mail: urniif@urniif.ru;²ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии УО РАН», Екатеринбург, e-mail: 2134012@gmail.com

Микобактерии туберкулеза (МБТ) действуют угнетающе на функционально – метаболические свойства лейкоцитов всех исследуемых животных (резистентных и чувствительных к туберкулезу – морские свинки, крысы, мыши), но в разной степени. У животных, способных значительно усилить биосинтез АК, таурина и глутатиона в печени и поддерживать высокий уровень восстановленных глутатиона и таурина в лейкоцитах, туберкулезный процесс не развивается (крысы, мыши). И, напротив, при неспособности организма к повышенному образованию этих метаболитов и поддержанию их уровня в лейкоцитах крови туберкулезный процесс быстро прогрессирует (морские свинки). Биологически активные молекулы – активные формы кислорода и высокоактивные соединения азота в первом случае могут проявлять в лейкоцитах крови защитные свойства, а во втором – повреждающие. Однако, у всех исследуемых животных снижаются показатели индекса стимуляции метаболической активности фагоцитов крови после введения им культуры МБТ

Ключевые слова: экспериментальный туберкулёз, лейкоциты, аминокислоты крови, оксид азота, фагоцитоз**FUNCTIONALLY-METABOLIC FEATURES OF BLOOD LEUCOCYTES
IN INTERSPECIFIC TB RESISTANCE IN EXPERIMENTAL ANIMALS****¹Pavlov V.A., ^{1,2}Kotomtsev V.V., ¹Megvinski I.D., ¹Sabadash E.V.,
¹Ershova A.V., ¹Kravchenko M.A.**¹FGBI «Ural Research Institute Phthiopulmonology Health Ministry», Ekaterinburg,
e-mail: urniif@urniif.ru;²FGBUN «Institute of Immunology and Physiology UO RAS», Ekaterinburg, e-mail: 2134012@gmail.com

Mycobacterium tuberculosis (MBT) are depressing to functional – metabolic properties of leukocytes of the test animals (resistant and susceptible to tuberculosis – guinea pigs, rats, mice), but to varying degrees. Animals that can significantly enhance the biosynthesis of AK, taurine and glutathione in the liver and maintain high levels of reduced glutathione and taurine in white blood cells, the process does not develop tuberculosis (rats, mice). In contrast, when the body's inability to increased formation of these metabolites and maintain their level in blood leukocytes tuberculosis process progressing rapidly (guinea pig). Biologically active molecules – reactive oxygen and nitrogen compounds are highly active in the first case may be a blood leukocytes protective properties, and in the second – damaging. However, all test animals reduced stimulation index indicators of metabolic activity of phagocytes of the blood after administration Mycobacterium tuberculosis.

Keywords: experimental tuberculosis, white blood cells, blood amino acids, nitric oxide, phagocytosis

Прогрессирование специфического туберкулезного процесса происходит на фоне снижения функциональных возможностей фагоцитирующих клеток на фоне повышенного образования в организме активных форм кислорода (АФК) и снижении антиоксидантных механизмов защиты [3, 7, 10]. Накапливается все больше данных о том, что большое значение в механизмах защиты и повреждения при туберкулезном процессе могут иметь высокоактивные соединения азота (ВСА) [3, 7, 8]. Однако окончательной ясности о роли этих биологически активных молекул в механизмах защиты и повреждения при туберкулезе нет. Лейкоциты крови принимают активное участие в генерации АФК и ВСА [3, 7]. В последние годы появляется все больше сообщений о том,

что именно лейкоциты крови могут играть существенную роль в неспецифической резистентности к МБТ [3, 7]. Вполне вероятно эффект защиты происходит за счет генерации таких агрессивных молекул как АФК и ВСА, но сведений посвященных этим вопросам недостаточно.

Целью настоящего исследования было уточнить значение функционально – метаболических особенностей лейкоцитов крови в механизмах защиты и повреждения у животных с разной степенью устойчивости к туберкулезу после заражения их МБТ.

Материалы и методы исследования

Для проведения эксперимента были взяты устойчивые к МБТ крысы, мыши, и высокочувствительные к МБТ морские свинки.

Исследования проводились на беспородных белых крысах, мышах и морских свинках из питомника Уральского НИИ Фтизиопульмонологии, которые содержались в стандартных условиях вивария согласно принятым требованиям. Всего в исследованиях было 16 морских свинок (10 опытных и 6 контрольных) в возрасте 3–4 месяца массой 250–300 г, 16 крыс (10 опытных и 6 контрольных) в возрасте 3 месяца массой 200–250 гр. и 25 мышей (15 опытных и 10 контрольных) массой 50 гр. План эксперимента был рассмотрен и утвержден биоэтической комиссией УНИИФ.

Для воспроизведения экспериментального туберкулеза использовали музейный штамм микобактерий центрального НИИ туберкулеза H37Rv (1993 г.). Морские свинки заражались 2-х недельной живой культурой в паховую складку в дозе 0,001 мг, крысы дозой 0,1 мг, мыши дозой 0,1 мг в хвостовую вену. Выведение животных из эксперимента производилось через 6 недель после заражения при развитии у морских свинок генерализованного туберкулеза.

Для определения исследуемых показателей у животных под наркозом забирали кровь из сердца. Для биохимических исследований были заморожены образцы сыворотки крови и лейкоцитарной взвеси. Проводили исследования фагоцитарной активности лейкоцитов крови общепринятыми методами, метаболической активности лейкоцитов в НСТ тесте. При помощи иммуноферментного анализатора в плазме крови и лейкоцитах исследовали уровень суммарных перекисей липидов (по показателям OXYSTAT) и стабильных производных (нитрата) оксида азота, количество свободных аминокислот и глутатиона. определяли при помощи газожидкостной хроматографии.

В плазме крови находили содержание аскорбиновой и дикетогулоновой кислот общепринятыми методами.

В лабораторной части эксперимента использовали следующие методы и диагностические тест-системы:

1. У всех животных были подсчитаны процент фагоцитирующих нейтрофилов, число поглощенных бактерий на 1 мкл, базальный и стимулированный продигозаном уровни НСТ-теста, коэффициент стимуляции
2. OXYSTAT определяли при помощи набора BiomedicaGRUPPE

3. Производные оксида азота (нитрит) находили по методу RandDSYSTEMS,

4. Содержание глутатиона восстановленного и окисленного, а так же свободных аминокислот плазмы крови и лейкоцитов, определяли на газожидкостном анализаторе ААА 339М «Микротехника», при этом перед исследованием на содержание аминокислот плазму крови и лейкоцитарную взвесь депротеинизировали 50% раствором трихлоруксусной кислоты.

5. Содержание аскорбиновой и дикетогулоновой кислот определяли с использованием парадиметиламинобензальдегида [2].

При обработке полученных данных мы применяли непараметрические методы с использованием программы Excel. Оценка степени достоверности различий между группами оценивалась по критерию «U» Манна–Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение

На момент выведения из эксперимента у всех зараженных морских свинок разви-

вался генерализованный туберкулез с преимущественным поражением селезенки, печени, лимфоузлов, легких. У крыс и мышей не смотря на то, что доза заражения была в 100 раз большей, туберкулезный процесс не развивался.

Установлено, что у животных с различной видовой устойчивостью к МБТ генерация ВСА в организме в ответ на заражение музейным штаммом МБТ-Н37 гv значительно отличается. Так у морских свинок количество конечного продукта окисления ВСА – нитрита в плазме крови возрастает после заражения от $56,0 \pm 11,2$ в контроле до $88,8 \pm 10,5$ мкмоль/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 ($26,14 - 31,9$ мкмоль/л соответственно). Следует отметить, что морские свинки располагают вообще большими ресурсами ВСА, поскольку в контроле содержание нитрата в плазме у этих животных более чем в 2 раза превосходит таковой у крыс ($p < 0,01$).

Обращает на себя внимание, что у морских свинок так же гораздо более высокие показатели суммарных перекисей липидов определяемых по оксистату. Их содержание в крови у здоровых морских свинок составляет $394,46 \pm 54,8$ мкмоль/л., в то время как у зараженных – $609,53 \pm 143,40$ ($p < 0,01$). У крыс их содержание $145,4 \pm 31,6 - 163,8 \pm 18,8$ мкмоль/л соответственно, то есть, изменений после заражения практически не наблюдается ($p > 0,05$). Разница между морскими свинками и крысами по уровню суммарных перекисей в контрольных группах составляет, примерно, в 2 раза ($p < 0,01$).

Но после заражения МБТ это различие становится почти 4х кратным. При этом у крыс увеличения показателей оксистата практически не наблюдается, а у морских свинок его уровень резко возрастает (почти в 2 раза – $p < 0,01$).

Нитрит является конечным метаболитом ВСА генерируемых эндотелием, фагоцитами, а оксистат – показатель конечных метаболитов превращения свободных радикалов кислорода – АФК [4, 6]. Поэтому динамика значений нитрита и оксистата в крови является неким интегральным показателем способности организма генерировать ВСА и АФК. А общее состояние организма животных после заражения отражает его способность оперировать с этими биологически активными и достаточно агрессивными молекулами.

Защитный или повреждающий эффект АФК и ВСА при туберкулезе зависит от состояния антиоксидантной и других защитных систем организма [4,6] и модулирует

ся такими метаболитами как аскорбиновая кислота, глутатион восстановленный или окисленный, таурин, аргинин и рядом других биологически активных веществ синтезируемых в печени и других органах [5, 8, 9]. Было установлено, что в печени крыс после заражения значительно возрастает количество аскорбиновой кислоты (АК) (почти в 3 раза – $p < 0,01$), а у морских свинок (которые в отличие от крыс не могут ее синтезировать) наблюдается ее более чем 2 кратное уменьшение ($p < 0,01$) (табл. 1).

Противоположные изменения претерпевают и метаболиты АК. В печени морских свинок увеличивается содержание дикетоглуконовой кислоты (ДКГК) (448 мкг/г в контроле до 864 мкг/г после заражения $p < 0,05$), а у крыс существенных изменений количества этого метаболита не происходит ($p > 0,05$).

Противоположную направленность имеют изменения количества такого метаболита как глутатион, имеющего тесную взаимосвязь с обменом АК.

У морских свинок в печени после заражения значительно увеличивается количество глутатиона окисленного (Г-SS-Г) (до 1438,8 мкг/г – $p < 0,01$), который и в контроле был несколько больше, чем у крыс. Надо отметить, что и ресурс глутатиона восстановленного (Г-SH) в печени морских свинок гораздо выше, чем у крыс (712,5 против 433,2 мкг/г – различие достоверно – $p < 0,01$) (табл. 2).

Как видим в защитных механизмах к воздействию МБТ у крыс преобладает АК и усиливается ее биосинтез, тогда как

у морских свинок после заражения МБТ содержание АК резко уменьшается, но увеличивается ее метаболит ДКГК, который может включаться в метаболические процессы необходимые для поддержания глутатиона в восстановленном состоянии (пентозный цикл) [7, 8]. При этом общее количество глутатиона у морских свинок резко возрастает и он интенсивно окисляется. АК и глутатион мощные антиоксиданты и биологические молекулы, выполняющие важнейшую защитно-адаптивную функцию на метаболическом уровне. В том числе, и по отношению к туберкулезной инфекции [3, 5, 7, 8]. Как видим, преобладание АК у крыс на этом уровне связано с их высокой устойчивостью к МБТ, а преобладание глутатионовой системы у морских свинок делает их абсолютно беззащитными к туберкулезу.

При этом установлено, что помимо АК в высокой устойчивости крыс к МБТ может иметь отношение такой метаболит как таурин, являющийся антиоксидантом, стабилизатором мембран и стимулятором фагоцитарных реакций организма [5, 9]. Среди всех свободных аминокислот тканей крыс таурин составляет до 50% и более [5], а у морских свинок таурина в тканях на порядок, а то и на 2 меньше, чем у крыс. Так, например, в костном мозге крыс содержание таурина составляет $5859,1 \pm 620,4$ а у морских свинок $468,7 \pm 71,1$ мкг/г, почти столь же значительны отличия и по содержанию глутатиона восстановленного в костном мозге (Г-SH) $1199,4 \pm 142,5$ против – $422,9 \pm 67,1$ мкг/г (во всех случаях $p < 0,01$).

Таблица 1

Содержание аскорбиновой кислоты в печени морских свинок и крыс после заражения МБТ(в мкг/г)

Группы животных (количество в группе)	Контроль (интактные n = 6)	Заражение МБТ n = 10
Морские свинки	$142,4 \pm 21,5$ (83,0–196,7)	$74,2 \pm 15,4$ (25,3–123,1)*
Крысы	$225,6 \pm 42,1$ (132,4–364,5)	$736,2 \pm 56,8$ (284,6–1376,8)*

Таблица 2

Содержание глутатиона восстановленного и окисленного в ткани печени морских свинок и крыс после заражения МБТ (в мкг/г сырого веса ткани)

Вид животных	Показатели	Контроль (интактные n = 6)	Заражение МБТ (n = 10)
Морские свинки	Глутатион восстановленный	$712,5 \pm 87,5$ (462,7–1158,0)	$585,7 \pm 59,4$ (349,6–822,9)
	Глутатион окисленный	$465,9 \pm 72,8$ (246,8–725,0)	$1438,8 \pm 218,1$ (869,3–2150,9)**
Крысы	Глутатион восстановленный	$433,2 \pm 31,5$ (366,1–465,8)	$296,7 \pm 58,9$ (112,5–420,2)
	Глутатион окисленный	$394,6 \pm 89,6$ (197,5–771,4)	$356,2 \pm 96,5$ (97,8–577,2)

Примечание. * Отмечены результаты статистически достоверно отличающиеся от контроля ($p < 0,05$); ** – $p < 0,01$.

Таблица 3

Оценка фагоцитарной способности нейтрофилов у морских свинок, крыс и мышей зараженных МБТ

Вид животных	Показатели фагоцитоза	Зараженные МБТ (n = 10)	Интактные (контроль) (n = 6)
Морские свинки	Средний процент фагоцитирующих нейтрофилов	73,6* (65,4–82,5)	81,75(76,1–87,0)
	Среднее число поглощенных бактерий на 1 мкл	6,8* (4,9–9,9)	9,4 (7,2–11,1)
Крысы	Средний процент фагоцитирующих нейтрофилов	76,5 (60,5–87,5)	82,8 (78,5–92)
	Среднее число поглощенных бактерий на 1 мкл	4,0 (3,3–4,9)	4,88 (3,7–6,6)
Мыши	Процент фагоцитирующих нейтрофилов	76,1 (71–79)	68,5(48,3–76,1)
	Число поглощенных бактерий на 1 кл	6,6 (5,6–7,9)	6,1 (4,8–7,6)

Пр и м е ч а н и е . *Отмечены результаты сравнений с интактной группой (контроль) $p < 0,05$.

Таблица 4

Средние показатели НСТ-теста у морских свинок, крыс и мышей (% метаболически активных клеток)

Группы животных	Показатели НСТ-теста	Зараженные МБТ (n = 10)	Интактные (контроль n = 6)
Морские свинки	Базальный уровень, %	47,4 (29,6–62,8)*	64,6 (38,2–94,5)
	Стимулированный продигозаном, %	28,1 (16,5–44,7)*	88,2 (48,3–100)
	Коэффициент стимуляции	0,6 (0,3–0,7)*	1,4 (0,6–1,8)
Крысы	Базальный уровень, %	25,9 (21–35)	21,4 (9–32)
	Стимулированный продигозаном, %	45,5 (40–58)	47,6 (35–65)
	Коэффициент стимуляции	1,88 (1,2–2,8)	2,46 (1,9–4,4)
Мыши	Базальный уровень, %	36,6 (31–46)	26 (12–36)
	Стимулированный продигозаном, %	47,3 (35–54)	54 (32–64)
	Коэффициент стимуляции	1,3 (1,1–1,6)	2,1 (1,2–2,5)

Пр и м е ч а н и е . * Отмечены результаты сравнения с интактными животными (контроль) $p < 0,05$.

На фоне отмеченных метаболических сдвигов в печени, во многом обеспечивающей метаболитами антиоксидантные системы организма, существенные изменения претерпевают функционально – метаболические показатели лейкоцитов крови.

Установлено, что их фагоцитарная активность у морских свинок после заражения МБТ статистически значимо снижается как по числу фагоцитирующих клеток так и по числу поглощенных бактерий на 10–15% ($P < 0,05$). Метаболическая активность по НСТ-тесту так же подавлена примерно на 25% ($p < 0,05$) и не восстанавливается после стимуляции продигозаном (табл. 3, 4).

У крыс, после заражения микобактерией туберкулеза H37Rv, 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 хотя и не достоверно ($p > 0,05$) (табл. 3, 4).

Обращает на себя внимание то обстоятельство, что у всех исследуемых животных снижаются показатели индекса стимуляции метаболической активности фагоцитов крови после введения им культуры МБТ H37Rv (табл. 4). То есть МБТ даже у устойчивых к ним крыс действуют угнетающе на фагоциты. Напомним, что супрессию фагоцитоза мы наблюдали и у человека при различных формах туберкулеза [1].

Отмеченные изменения в функциональной и метаболической активности лейкоцитов крови подопытных животных происходят на фоне значительных изменений в содержании в этих клетках глутатиона восстановленного и окисленного, а так же таурина. Так, если количество глутатиона восстановленного и окисленного в лейкоцитах морских свинок определяется в «следовых» значениях, как в контроле, так и после заражения, то у крыс его уровень составляет в контроле – 11,6 мкмоль/л, а после заражения – 25,2 мкмоль/л, то есть увеличивается более чем в 2 раза ($p < 0,01$).

Существенны отличия и по содержанию таурина в крови экспериментальных животных. В контроле у морских свинок – 47,6 мкмоль/л, а после заражения – 41,5 мкмоль/л. У крыс – 124,8 мкмоль/л и 86,8 мкмоль/л, соответственно, то есть, так же как по глутатиону восстановленному отличие более чем в 2 раза ($p < 0,01$). Значительные отличия по содержанию глутатиона и аминокислот участвующих в его биосинтезе отмечены у морских свинок и крыс и другими авторами [8, 9]. Метаболические отличия во многом определяют специфичность формирования гранул у этих двух видов животных после заражения МБТ [10].

Таким образом, метаболитов обеспечивающих стабильность мембран и поддерживающих метаболическую активность в лейкоцитах крыс в 2 раза больше, чем у морских свинок и после заражения концентрация их либо увеличивается, либо сохраняется на контрольном уровне.

Выводы

1. После заражения МБТ у всех зараженных морских свинок развивался генерализованный туберкулез с преимущественным поражением селезенки, печени, лимфоузлов, легких. У крыс, не смотря на то, что доза заражения была в 100 раз больше, чем у морских свинок, туберкулезный процесс не развивается.

2. МБТ действуют угнетающе на метаболическую активность фагоцитов крови всех исследуемых животных, но у устойчивых к туберкулезу крыс отчетливого угнетения фагоцитарной активности не наблюдается.

3. В защитных механизмах по отношению к МБТ у крыс преобладает генерация в лейкоцитах АФК с высоким уровнем антиоксидантной защиты в них процесс не развивался.

4. Решающее значение в межвидовой устойчивости к туберкулезу имеют особенности обменных процессов в печени и лейкоцитах крови – способность синтезировать в больших количествах АФК и таурин, поддерживать в восстановленном состоянии глутатион.

5. Высокие показатели перечисленных метаболитов обеспечивают защитные свойства таких агрессивных биомолекул, как АФК и ВСА. И напротив при их недостатке АФК и ВСА начинают проявлять повреждающие свойства обуславливающие прогрессирование туберкулезного процесса.

Список литературы

1. Бердюгина О.В., Скорняков С.Н., Медвинский И.Д., Ершова А.В., Павлов В.А., Бердюгин К.А. Гуморальная регуляция иммунного ответа при туберкулезе легких. Уральский медицинский журнал № 2. – 2013. – С. 144–149.
2. Дудин В.И. Способ определения витамина С (патент) № 2229132 от 20.05.2004.
3. Каминская Г.О. Оксид азота – его биологическая роль и участие в патологии органов дыхания // Пробл. туберкулеза и болезней легких. – 2004. – № 6. – С. 3–11.
4. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Чесовских Н.Ю., Старикова Е.Г. Модуляция апоптоза мононуклеаров в условиях окислительного стресса // Бюлл. Эксперим. Биологии и медицины. – 2008. – Т. 145, № 3. – С. 251–254.
5. Павлов В.А. Механизмы повреждения и адаптации в организме при экспериментальном туберкулезе в условиях действия ароматических ксенобиотиков. дисс. докт. мед. наук. – Екатеринбург, 2000. – 318 с.
6. Стариков Ю.В. Роль молекул оксида азота в программной гибели нейтрофилов при окислительном стрессе. – Автореф. дисс. На соискание ученой степени канд. Мед. Наук. – Новосибирск, 2012. – 30 с.
7. Тюлькова Т.Е., Чугаев Ю.П., Кашуба Э.А. Иммунологические особенности туберкулезной инфекции на различных этапах ее развития. – Тюмень: ООО «Сити – пресс», 2008. – 650 с.
8. Guerra C., Johal K., Morris D., Control of Mycobacterium tuberculosis growth by glutathione enhanced natural killer cells // Clin. and Immunol. 1012, 168(1): 148–152.
9. Grimbé F.R., The effects of sulfur amino acid intake on immune function in human s// J. Nutr. 2006; 136(6):1660–1665.
10. Turner O.C., Basarab R.J., Frank A.A. Granuloma formation in mouse and guinea pig models of experimental tuberculosis // Cellul. and Mol. Mechanismus 2003; 6: 65–84.