

УДК 57.084.1: 616.9–092.9

РОЛЬ ОСОБЕННОСТЕЙ МЕТАБОЛИЗМА СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ В МЕЖВИДОВОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К ТУБЕРКУЛЕЗУ

¹Павлов В.А., ^{1,2}Котомцев В.В., ¹Сабадаш Е.В., ¹Медвинский И.Д.

¹ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии», Минздрава РФ
(УНИИФ), Екатеринбург;

²ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии УО РАН» (ИИФ), Екатеринбург,
e-mail: 2134012@gmail.com

Особенности метаболизма соединительной ткани (СТ), связанные с различиями в обмене аскорбиновой кислоты (АК), глутатиона и ряда аминокислот у морских свинок и крыс, могут влиять на их различную чувствительность к микобактерии туберкулёза (МБТ). Связанные с отмеченными особенностями патогенетические механизмы предрасположенности и развития туберкулезного процесса напоминают таковые при патологических процессах, развивающихся при дисплазии соединительной ткани (ДСТ). Возможно, метаболиты, делающие крысу более устойчивой, чем морскую свинку, к туберкулезу, могут быть использованы в коррекции нарушений, развивающихся при ДСТ.

Ключевые слова: экспериментальные животные, соединительная ткань, туберкулез, аскорбиновая кислота, глутатион, аминокислоты, активные формы кислорода, высокоактивные соединения азота

THE ROLE OF FEATURES OF METABOLISM IN CONNECTIVE TISSUE IN CROSS-SPECIES RESISTANCE TO TUBERCULOSIS

¹Pavlov V.A., ^{1,2}Kotomtsev V.V., ¹Sabadash E.V., ¹Medvinsky I.D.

¹Ural research Institute of Phthisiopulmonology, Ministry of healthcare of the Russian Federation (UNIF),
Ekaterinburg;

²Institute of immunology and physiology RAS UO (IIF), Ekaterinburg, e-mail: 2134012@gmail.com

The characteristics of connective tissue metabolism (CT) associated with differences in the metabolism of ascorbic acid (AC), glutathione and a number of amino acids in guinea pigs and rats that can affect their different sensitivity to mycobacterium tuberculosis (MBT). The pathogenetic mechanisms of the predisposition and development of the tuberculosis process associated with the noted features resemble those in the pathological processes developing with connective tissue dysplasia (DST). Perhaps the metabolites that make the rat more stable than the guinea pig to tuberculosis can be used to correct disorders developing in DST.

Keywords: experimental animals, connective tissue, tuberculosis, ascorbic acid, glutathione, amino acids, reactive oxygen species, highly reactive nitrogen compounds

В последние годы во многих развитых странах нарастает такое явление, как дисплазия соединительной ткани (ДСТ) [4,8]. Явления ДСТ сопровождаются самыми разнообразными патологическими процессами – от нарушений психики до тяжелых расстройств кровообращения и нарушений иммунитета. Соединительная ткань (СТ) имеет тесные взаимосвязи с нервной, кровеносной, иммунной системами, системой детоксикации и другими адаптивными системами организма [8]. Установлено, что при ДСТ имеется дефицит аскорбиновой кислоты (АК) и магния, имеется диспропорция в содержании аминокислот, участвующих в метаболизме СТ. В связи с чем нарушены процессы образования коллагеновых волокон и другие метаболические процессы в фибробластах. Однако более детально причины возникновения ДСТ и какое значение они могут иметь в развитии патологических процессов во многом не известно [4].

Поэтому целью наших исследований было выявить взаимосвязь метаболических процессов, определяющих специфику за-

щитных механизмов к микобактерии туберкулеза (МБТ) в организме подопытных животных с различным строением СТ.

Материалы и методы исследования

Для экспериментов были взяты крысы и морские свинки – СТ которых, как и адаптивно-метаболические процессы, резко отличаются. Так, СТ крыс грубоволокнистая и плотная, а у морских свинок – рыхлая и нежноволокнистая. Морские свинки, в отличие от крыс, не способны синтезировать АК имеющую большое значение в обмене СТ. Возможно именно поэтому они высоко чувствительны к МБТ [7]. В эксперимент было взято по 20 морских свинок и 20 беспородных белых крыс питомника Уральского НИИ фтизиопульмонологии, разделённых по 10 животных на контрольных и опытных. Протокол эксперимента был рассмотрен и одобрен биоэтической комиссией Уральского НИИ фтизиопульмонологии.

В наших исследованиях крысы опытной группы подвергались заражению МБТ в дозе 0,1 мг живой культуры в хвостовую вену, морские свинки опытной группы заражались МБТ в дозе 0,001 мг в паховую складку живой культуры микобактерий штамма H37Rv. Контрольным животным вводился, в этих же дозах и местах инъекций, физиологический раствор хлорида натрия.

У всех зараженных животных исследовались параметры экспериментального туберкулеза: морфологические данные, микробиологические исследования, индексы поражения и весовые коэффициенты [7]. Находилось количество в тканях оксипролина, уровень аскорбиновой кислоты и ее производных – дегидроаскорбиновой кислоты (ДАК) и дикетогулоновой кислоты (ДКГК) общепринятыми методами [1,2].

На хроматографе ААА 339 «Микротехника» определялось количество свободных аминокислот, глутатиона, полиаминов, мочевины в замороженных в жидком азоте тканях исследуемых животных. На основании полученных данных исследовалась динамика количества аминокислот, связанных с обменом СТ (пролин, оксипролин, глутамат), и участвующих в биосинтезе глутатиона (аргинин, цистеин, глицин), а также содержание глутатиона, восстановленного и окисленного, полиаминов (путресцин).

Активные формы кислорода (АФК) и высокоактивные соединения азота (ВСА), являясь высокоактивными биологическими молекулами, оказывают регуляторное воздействие на обмен СТ, усиливая катаболические процессы в ней [8]. Поэтому с помощью иммуноферментного анализатора определялся уровень производных оксида азота и активных форм кислорода в крови исследуемых животных. При помощи иммуноферментного анализатора в плазме крови и лейкоцитах исследовали уровень суммарных перекисей липидов (по показателям OXYSTAT BiomedicaGRUPPE) и стабильных производных (нитрата) оксида азота. Животные выводились из эксперимента через 2 недели после заражения МБТ в период, когда у морских свинок развивался генерализованный туберкулез. Статистическую обработку полученного материала проводили с помощью непараметрических критериев Манна-Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение

После заражения МБТ через 2 недели у морских свинок развивается генерализованный туберкулез. У крыс даже при использовании гораздо большей дозы МБТ специфический процесс не развивается. Некоторые органы морских свинок при этом значительно увеличиваются. Так, масса печени возрастает на с 20,9 г до 34,4 г, селезенки – с 1,06 до 4,3 г, легких – с 3,8 до 9,6 г. Отмеченное увеличение происходит, видимо, за счет интенсивного включения про-

лина в оксипролин СТ. Что подтверждается увеличением количества оксипролина в ткани печени зараженных морских свинок до $858,3 \pm 36,1$, тогда как у контрольных животных его уровень составил $88,2$ мг/100 г сухой ткани.

Изменения массы органов крыс после заражения не происходит, хотя количество оксипролина в печени также несколько возрастает, но статистически достоверного отличия не наблюдается ($p > 0,05$). Количество оксипролина в печени контрольных крыс составило $650,6 \pm 25,6$ мг/100г, то есть в 7 раз больше, чем у морских свинок ($p < 0,01$). После заражения МБТ у крыс опытной группы количество оксипролина возрастает до $958,6 \pm 65,0$ ($p > 0,05$).

Существенным изменениям подвергалось содержание в крови и печени глутаминовой кислоты и пролина. В крови зараженных морских свинок при этом количество глутаминовой кислоты и пролина снижается примерно в 1,5 – 2 раза ($p < 0,01$). Очевидно, они используются для биосинтеза оксипролина в печени. В их печени резко уменьшается количества аргинина и мочевины, а также полиаминов, что свидетельствует о резком угнетении анаболических процессов и усилении катаболизма.

У крыс после заражения МБТ в большей мере в крови снижается количество пролина – примерно в 1,5 раза. В печени угнетения биосинтеза мочевины и полиаминов не наблюдается.

При отмеченных явлениях резко изменяется и приобретает диаметрально противоположный характер обмен аскорбиновой кислоты (АК) в тканях сравниваемых животных.

В печени крыс после заражения значительно возрастает количество 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).

Таблица 1

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

Группы животных / кол-во в группе	Контроль (n=10)	Заражение МБТ (n=10)
Морские свинки	$142,4 \pm 21,5$	$74,2 \pm 15,4^{**}$
Крысы	$252,6 \pm 42,4$	$736,3 \pm 112,5^{**}$

Значком ** отмечено статистически достоверное отличие ($p < 0,01$).

Еще более заметна динамика в содержании ДАК в печени исследуемых животных. У крыс наблюдается прирост ее количества после заражения МБТ в 2,5 раза.

Все это свидетельствует о том, что крысы активно синтезируют АК после заражения МБТ и она активно включается в обменные процессы, интенсивно окисляясь до ДАК.

А вот у морских свинок АК существенного значения при заражении МБТ не имеет. Но обращает на себя внимание то, что у этих животных в печени определяются гораздо большие концентрации, чем у крыс ДКГК. При воздействии МБТ количества этой кислоты увеличивается почти в 2 раза, тогда как у крыс никаких изменений количества этого метаболита не наблюдается.

У морских свинок после заражения МБТ в печени в 3 раза ($p < 0,01$) увеличивается количество глутатиона окисленного (G-SS-G), тогда как количество глутатиона восстановленного (G-SH) имеет лишь тенденцию к снижению. У крыс статистически достоверных изменений количества G-SH после введения МБТ не отмечается. Надо отметить, что и ресурс G-SH в печени морских свинок гораздо выше, чем у крыс (712,5 мкг/г против 433,2 мкм/г $p < 0,01$) (табл. 2).

У крыс такого значительного уменьшения в рассматриваемых тканях количества перечисленных метаболитов не наблюдается.

В крови и печени крыс не отмечается цистеина и промежуточных метаболитов его образования из метионина – цистатионина и цистеиновой кислоты. Тогда как метионин, напротив, встречается в крови и печени крыс, но его нет у морских свинок.

Как видим, в защитных механизмах к воздействию МБТ у крыс преобладает АК с усилением ее биосинтеза. А у морских свинок содержание АК резко уменьшается, но увеличивается метаболит СТ, связанный с обменом АК- ДКГК, который может включаться в метаболические процессы, необходимые для поддержания глутатиона в восстановленном состоянии (пентозный цикл). 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 [3]. Установлено, что помимо АК, в высокой устойчивости крыс к МБТ может иметь такой метаболит, как таурин, являющийся антиоксидантом, стабилизатором мембран и стимулятором

Таблица 2

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

Метаболиты	Контроль (n=10)	Заражение МБТ (n=10)
Морские свинки		
Глутатион восстановленный	712,5±87,5	585,7±59,4
Глутатион окисленный	465,9±72,8	1438,8±218,1**
Крысы		
Глутатион восстановленный	433,2±31,5	296,7±58,9
Глутатион окисленный	394,6±89,6	356,2±96,5

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

В печени морских свинок гораздо большее количество аминокислот, предшественников глутатиона. Количество глутаминовой кислоты, глицина и цистеина в крови и печени морских свинок в 2 и более раза превосходит таковое у крыс. После заражения МБТ количество этих метаболитов в крови и печени морских свинок резко уменьшается. Очевидно, за счет включения их в глутатион, биосинтез СТ и потребление

фагоцитарных реакций организма [7, 9, 10]. Среди всех свободных аминокислот тканей крыс таурин составляет до 50% и более. А у морских свинок таурина в тканях значительно меньше, чем у крыс. Так, в костном мозге крыс содержание таурина составляет 5859,1±620,4 мкм/л а у морских свинок 468,7±71,1 мкм/л), почти столь же значительны отличия и по содержанию G-SH в костном мозге – 422,9±67,1 мкм/л

у морских свинок против $1199,4 \pm 142,5$ у крыс ($p < 0,01$).

В целом различная чувствительность морских свинок и крыс к МБТ связана, по нашему мнению, с различными особенностями метаболизма серы. У крыс сера в большей мере окисляется до таурина и сульфата. Последний накапливается в СТ в виде кислых гликозаминогликанов, во многом определяющих свойства грубоволокнистой СТ крыс и активное участие ее в детоксикационных и обменных процессах (например, биосинтез АК).

Установлено, что после заражения количество сульфата (SO_4) в печени морских свинок уменьшается почти в 2 раза (от 498,8 мкг/г до 261,9 мкг/г; $P < 0,01$), а вот у крыс его количество было изначально больше, чем у морских свинок и после заражения еще несколько увеличивается (с $1246,4 \pm 345,1$ мкг/г до $1447,4 \pm 276,7$ мкг/г; $P > 0,05$). То же самое касается и иона SO_3 , который присутствует в организме в виде таурина ($\text{NH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—SO}_3$). Количество таурина в печени крыс после введения им МБТ резко увеличивается (с $525,2 \pm 28,9$ мкг/г до $1657,5 \pm 425,1$ мкг/г; $P < 0,01$), очевидно, вследствие его усиленного биосинтеза из цистеина. В печени морских свинок содержание таурина составляет $129,8 \pm 17,6$ мкг/г, а после заражения МБТ $251,6 \pm 31,4$ мкг/г. То есть, увеличение есть, но оно не сопоставимо с таковым у крыс.

У морских свинок СТ рыхлая. Особенности ее обмена сопряжены не синтезом АК, а образованием ДКГК, необходимой для восстановления глутатиона [5]. В крови и печени морских свинок сера находится в виде цистеина и промежуточных продуктов его образования (цистотионин, цистеиновая кислота). При заражении МБТ этих продуктов становится еще больше, а количество цистеина возрастает в крови на 45 % (в контроле $227,8 \pm 17,3$ мкмоль/л).

Таким образом, особенности обмена в СТ влияют на пути использования серы в защитно-адаптивных механизмах и на различную устойчивость морских свинок и крыс к МБТ.

Обращает на себя внимание, что при заражении МБТ в крови морских свинок отчетливо возрастает уровень активных форм кислорода и высокоактивных соединений азота (АФК и ВСА) – важнейших регуляторных биомолекул, способных выполнять как защитные функции, так и оказывать повреждающее воздействие [3].

Содержание стабильных производных оксида азота (нитрата) и суммарных перекисей липидов (по оксистату) в крови морских свинок в контроле составляет $56,3 \pm 11,2$ мкмоль/л, свободных перекисей

липидов – $394 \pm 126,1$ мкмоль/л. После заражения МБТ отмечается увеличение рассматриваемых показателей, примерно, на 50 % ($p < 0,05$).

Содержание производных оксида азота (нитрат) и суммарных перекисей липидов (по оксистату) в крови крыс составляет $26,1 \pm 2,9$ мкмоль/л и $145,0 \pm 31,6$ мкмоль/л, соответственно. После заражения МБТ существенных изменений рассматриваемых показателей не отмечается.

Такое различие в уровнях метаболитов АФК и ВСА после заражения МБТ, очевидно связано с различием в стратегии защитных механизмов у сравниваемых животных. Так в печени у крыс после заражения более чем в 3 раза увеличивается количество таурина, которое и без того превосходило таковое у морских свинок в 4 раза. Мощный антиоксидантный эффект АК и таурина, естественно, не позволяют чрезмерно увеличивать уровень АФК и ВСА в тканях крыс после экстремальных воздействий и ограничивают их повреждающее воздействие. Так, в наших предыдущих исследованиях [6] установлено, что после заражения МБТ, токсического воздействия ксенобиотиков, кровопотери, воздействия радиации в печени крыс исчезают такие метаболиты, как фосфоэтанолламин (ФЭА), этаноламин (ЭА) и серин – метаболиты необходимые для биосинтеза мембран, и увеличивается количество таурина. То есть происходит усиление пластических процессов с повышением стабилизации мембран клеток печени, необходимое для усиления детоксикационных, анаболических и других адаптивных механизмов [6]. У морских свинок возможности такой стабилизации нет.

Итак, стратегия метаболической адаптации морских свинок к воздействию МБТ ориентирована на усиленное образование глутатиона с его интенсивным включением в окислительные процессы и значительным увеличением СТ в пораженных специфическим процессом органах, что абсолютно не защищает морскую свинку по отношению к МБТ.

В наших предшествующих исследованиях установлено, что применение таурина повышает устойчивость морских свинок к МБТ и эффективность лечения туберкулеза у больных туберкулезом легких [6]. При этом снижается уровень АФК и ВСА в крови больных туберкулезом легких людей и экспериментальных животных.

Выводы

Различное строение соединительной ткани у морских свинок и крыс сопряжено с преобладанием в защитных механизмах

к воздействию МБТ глутатиона и апоптоза или аскорбиновой кислоты и таурина.

При преобладании в защитных механизмах аскорбиновой кислоты и таурина (у крыс) организм более устойчив к заражению МБТ при большей устойчивости мембран клеток к АФК и ВСА.

Защитные либо повреждающие эффекты АФК и ВСА неспецифичны и зависят от стратегии защитных механизмов в организме, в которых может преобладать система глутатиона, либо таурин, блокирующий систему глутатиона и его окисление.

В коррекции патологических процессов при ДСТ, видимо, могут использоваться такие метаболиты как таурин, АК, аргинин.

Работа выполнена согласно требованиям НИОКР УНИИФ Минздрава РФ № 114032140001 и 01201352042 ИИФ УО РАН.

Список литературы

1. Дудин В.И. Способ определения витамина С / В.И. Дудин (патент № 2229132 от 20. 05.2004).
2. Замаева Т.В. Метод определения коллагеновых белков по оксипролину/ Т.В. Замаева // Современные методы в биохимии. – М: Медицина, 1977. – С. 262– 264.
3. Ивашкин В.Т. Клиническое значение оксида азота и белков теплового шока / В.Т. Ивашкин, О.М. Драпкина. – М.: ГЕОТАР – МЕДИА, 2011. – 376 с.
4. Кадурина Т.И. Дисплазия соединительной ткани: руководство для врачей / Т.И. Кадурина, В.Н. Горбунова. – СПб: Элби – Санкт-Петербург, 2009. – 704 с.
5. Лабори А. Регуляция обменных процессов / А. Лабори. – М.: Медицина, 1970. – 382 с.
6. Павлов В.А. Механизмы повреждения и адаптации в организме при экспериментальном туберкулезе в условиях действия ароматических ксенобиотиков: дис. ... докт. мед. наук. – Екатеринбург, 2000. – 318 с.
7. Першин Г.Н. Методы экспериментальной химиотерапии / Г.Н. Першин. Практическое руководство. – М.: Медицина, 1971. – 541 с.
8. Шиляев Р.Р. Дисплазия соединительной ткани и ее связь с патологией внутренних органов у детей и взрослых / Р.Р. Шиляев, С.Н. Шальнова // Вопросы современной педиатрии. – 2003. – Т. 2, № 5. – С. 61–67.
9. Harris R. Review: Taurine: A «very essential» amino acid / R. Harris, Sh. Wen // Mol. Vis. – 2012. – Vol.18. – P. 2673– 2686.
10. Павлов В.А., Котомцев В.В., Котомцев В.В., Медвинский И.Д., Сабадаш Е.В., Ершова А.В., Кравченко М.А. Функционально-метаболические особенности лейкоцитов крови в межвидовой устойчивости экспериментальных животных к туберкулезу // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 12–3. – С. 480–484; URL: <https://applied-research.ru/article/view?id=7960> (дата обращения: 28.07.2017).