

## КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

### ВЛИЯНИЕ АРГИНИНА НА ТЕЧЕНИЕ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО ПРОЦЕССА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА ЖИВОТНЫХ С РАЗЛИЧНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ К ТУБЕРКУЛЕЗУ

Скорняков С.Н., Сабадаш Е.В., Павлов В.А., Новиков Б.И., Медвинский И.Д.,  
Кравченко М.А., Ершова А.В., Родионова М.А.

ФГБУ «УНИИФ» Минздрава РФ, Екатеринбург, Россия

ФГБОУ ВПО «УГМУ», кафедра фтизиопульмонологии, г.Екатеринбург,  
Россия

#### **Резюме.**

**Цель** исследования: на модели экспериментального туберкулеза морских свинок изучить влияние аминокислоты аргинин на течение туберкулезного процесса.

**Методика.** 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. Животные были разделены на 4 группы: 3 группы морских свинок по 25 единиц (здоровый контроль, зараженные МБТ и зараженные МБТ, получающие аргинин) и 1 группа крыс (25 штук), массой 200-250 г. Возраст животных – 2-3 месяца. Морские свинки получали перорально аргинин: ежедневно в дозе 10мг/кг массы тела животного в течение 1 месяца. Лечение начиналось через 2 недели после заражения. Определяли в крови конечные продукты метаболизирования оксида азота – нитриты и нитраты, а также суммарные перекиси липидов методом

иммуноферментного анализа (ИФА). При этом использовали диагностические тест-системы - Biomedica GRUPPE и R & D Systems.

**Результаты.** 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). У крыс же достоверного увеличения этого вещества к контролю не наблюдается ( $26,14 - 31,9$  мкм/л соответственно).

**Заключение.** 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.

**Ключевые слова:** аргинин, оксид азота, туберкулез, морские свинки, крысы.

Skornyakov S. N., Sabadash E. V., Pavlov V. A., Novikov, B. I., Medvinsky I. D., Kravchenko M. A., Ershova V.A., Rodionova M.A.

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

### Summary

**The purpose** of the study: in the model of experimental tuberculosis of Guinea pigs to study the effect of the amino acid arginine on the clinical course of tuberculosis.

**Methods.** The experiments were performed on 75 Guinea pigs and 25 rats (weighing 200-250 g). To reproduce the experimental tuberculosis of Museum used a strain of mycobacteria Central tuberculosis research Institute H37Rv, 1993. The animals were divided into 4 groups: 3 groups of Guinea pigs of 25 (healthy control, MTI and MTI receiving arginine) and group 1 rats (25 pieces), ground 2100-250 Age animals 2-3 months. Guinea pigs received oral arginine daily dose of 10mg/kg of body weight within 1 month. Treatment was started 2 weeks after infection. The serum end-products of metabolizirovannom nitric oxide – nitrite and nitrate, as well as Oxystat was performed by enzyme immunoassay. Used diagnostic test kits following manufacturers: Biomedica GRUPPE, derivatives of nitric oxide (nitrites and nitrates) - R & D Systems.

**Results.** Found that in animals with different specific resistance of MBT, the generation of ICA in the body in response to infection of a Museum strain of MBT H37rv significantly different. So in Guinea pigs, the amount of the final product of the oxidation of the ICA – nitrate in plasma increased after infection  $56, \pm 11,2$  in control to  $88.8 \pm 10,5$  mm/l, approximately 1.6 times ( $p < 0.01$  to control). While in rats a significant increase of this substance to control is not observed ( $26,14 - 31,9$  mm/l, respectively). It should be noted that Guinea pigs have in General greater resources of the ICA, so as to control the contents of nitrate in their plasma more than 2 times higher than that of the rats.

**Conclusion.** In animals that do not exhibit resistance to tuberculosis infection, the high content in plasma derived nitric oxide caused by arginine is an unfavorable factor in the progression of tuberculosis.

**Keywords:** arginine, nitric oxide ,tuberculosis, Guinea pigs, rats.

**Введение.** Современная эпидемическая ситуация по туберкулезу в России остается неблагоприятной. Туберкулез легких претерпел отрицательный патоморфоз, что выразилось появлением большого количества остро прогрессирующих форм заболевания, характеризующихся

значительной распространенностью поражения, неблагоприятным течением и недостаточной эффективностью лечения [1,2,3,4,]. В этих условиях актуально изучение факторов, влияющих на течение специфического воспалительного процесса. Одним из таких факторов является оксид азота, уровень производных которого в плазме и нейтрофилах больных туберкулезом снижается параллельно тяжести процесса. При переходе очаговой формы в инфильтративную, количество нитрита может повышаться, но в терминальной стадии болезни наблюдается его снижение [5,6,7]. Описано прямое бактерицидное действие метаболитов оксида азота при туберкулезе, связанное с повреждающим действием на ДНК микобактерий [8]. Напротив, Л.В. Сахно и соавт. [9] 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 микобактерий туберкулеза связана с их резистентностью к оксиду азота.

В организме человека синтез оксида азота клетками осуществляется из аминокислоты L-аргинина. По данным литературы [10,11,7] оксид азота играет существенную роль в инвазии, репликации и поддержании латентного состояния внутриклеточных инфекций, в том числе и микобактерий туберкулеза. Он может с одной стороны, вызывать гибель патогенов и индуцировать процессы апоптотической гибели клеток хозяев, а с другой, участвует в подавлении иммунных реакций.

Таким образом, применение аргинина на фоне туберкулезного процесса 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: на модели экспериментального туберкулеза морских свинок изучить влияние аминокислоты аргинин на течение туберкулезного процесса.

**Методика.** Опыты проведены на 100 животных с различной чувствительностью к МБТ: 75 морских свинок и 25 крысах массой 200-250 г. Первые высокорезистентны к МБТ, а вторые чувствительны даже к единичным вирулентным микобактериям с развитием генерализованного туберкулеза. Животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении, свободном доступе к корму и питьевой воде. Для воспроизведения экспериментального туберкулеза использовали музейный штамм микобактерий центрального НИИ туберкулеза H37Rv 1993г. Морские свинки заражались в паховую складку в дозе 0,001 мг, крысы дозой 0,1 мг. 2х недельной живой культурой. Эксперимент был завершен через 6 недель после заражения при развитии у морских свинок генерализованного туберкулеза. Забор крови у животных производили из полости сердца. Всего в исследованиях было три группы морских свинок по 25 штук (здоровый контроль, зараженные МБТ и зараженные МБТ, получающие аргинин) и 25 крыс массой 200 – 250 гр. Возраст животных 2 – 3 месяца.

Аргинин использовался ежедневно в дозе 10 мг на кг массы тела животного в течение 1 месяца. Лечение начиналось через 2 недели после заражения. Оценку течения экспериментального туберкулеза проводили путем динамики массы тела и термометрии. Макроскопическую оценку изменений внутренних органов проводили путем определения индекса поражения по четырех балльной шкале, где 1 балл - минимальные изменения, 4 балла - максимальные.

Определяли в крови конечные продукты метаболизирования оксида азота – нитриты и нитраты, а также суммарные перекиси липидов методом иммуноферментного анализа (ИФА). При этом использовали диагностические тест-системы - Biomedica GRUPPE и R & D оксидата

осуществляли методом иммуноферментного анализа. При этом использовали диагностические тест-системы следующих производителей: OXYSTAT - Biomedica GRUPPE, производные оксида азота (нитриты и нитраты) - R & D Systems.

Математическая обработка. При обработке данных мы использовали непараметрические методы. Полученные данные обрабатывали в программе Excel. Оценка степени достоверности различий между группами оценивалась по критерию U – Манна – Уитни (Е.В. Гублер - Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. - Медицина,- 1978).

**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 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 как в контроле содержание нитрата в их плазме более чем в 2 раза превосходит таковой у крыс.

Обращает на себя внимание, что 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 оксиданта практически не наблюдается, а у морских свинок его уровень резко возрастает. Нитрат является конечным метаболитом ВСА генерируемых эндотелием, фагоцитами, а оксидат - конечным метаболитом превращения свободных радикалов кислорода – АФК. Поэтому динамика уровня нитрата и оксиданта в крови является неким интегральным показателем способности организма генерировать ВСА и АФК, а общее состояние организма зависит от его способности оперировать этими биологически активными и достаточно агрессивными молекулами.

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. У животных с различной видовой устойчивостью к МБТ генерация ВСА в организме в ответ на заражение МБТ отличается.
2. Динамика уровня нитрата и оксиданта в крови является интегральным показателем тяжести специфического процесса.
3. 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.

## **Литература**

1. Ерохин В. В., Земскова З. С. Современные представления о туберкулезном воспалении // Пробл. туб. – 2003. – № 3. – С. 11-21.
2. Карачунский М.А. Туберкулез в наши дни //Рус. мед. журн. – 2001. – т.9, №21 (140). – С. 951-953.
3. Суркова Л.К., Дюсьмикеева М.И. Остропрогрессирующий туберкулез легких: морфологические и бактериологические особенности. // Пробл. туб. – 2003. №3. – С. 33-35.
4. Чуканов В.И. Проблема излечения больных туберкулезом органов дыхания. // Рус. Мед. журн. – 2001. – Т. 6, №21(140). – С. 954-959.
5. Муравлева Л.Е., Казаченко Н.В. Пономарева О.А. // Сборник резюме 11-го национального конгресса по болезням органов дыхания. – М., 2001. – С. 230
6. Потапов И.В. Исследование нитроксидергических нарушений и их фармакологическая коррекция в клетках мононуклеарно-фагоцитирующей системы при туберкулезе легких: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Челябинск, 2002. 27 с.
7. Каминская Г.О. Оксид азота – его биологическая роль и участие в патологии органов дыхания //Пробл. туберкулеза и болезней легких.-2004.- №6.-С.-3-11.
8. Farnia P., Mohammad F., Tabatabai D.J., Masjedi M.R. //J. Tubercle. Lung Dis. – 1998; – Vol. 2 N 11. – Suppl. 2. - P. 396-397
9. Сахно Л.В., Хонина Н.А., Норкина О.В., Мостовая Г.В., Никонов С.Д. и др. Участие оксида азота в развитии туберкулезной анергии у больных туберкулезом легких //Пробл.туб. - 2001.-№.8.- С.42-46.
10. 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.
11. Park K.G.M., Hayes P.D., Garlic P.J. Stimulation of lymphocyte natural cytotoxicity by L-arginine //The Lancet. - 1991. - V. 337, N. 8742. - P. 645-646.

Ответственный за переписку: Новиков Б.И., к.м.н., с.н.с. ФГБУ УНИИФ, e-mail: [binovikov@mail.ru](mailto:binovikov@mail.ru), т. 8-950-658-2309