

УДК 616.9-092.9:57.084.1

## РОЛЬ ОСОБЕННОСТЕЙ МЕТАБОЛИЗМА ЖЕЛЕЗА И СЕРЫ В МЕЖВИДОВОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К ТУБЕРКУЛЕЗУ

<sup>1</sup>Павлов В.А., <sup>1,2</sup>Котомцев В.В., <sup>1</sup>Медвинский И.Д., <sup>1</sup>Кравченко М.А., <sup>1</sup>Сабадаш Е.В.

<sup>1</sup>ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии Минздрава РФ»,  
Екатеринбург, e-mail: urniif@urniif.ru;

<sup>2</sup>ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии УО РАН», Екатеринбург,  
e-mail: 2134012@gmail.com

С давних пор известно антимикробное действие оксидов серы, в том числе и на микобактерии туберкулеза. Но как может реализоваться такой эффект *in vivo* не известно. В наших исследованиях установлено, что крысы (устойчивые к туберкулезу животные) имеют в тканях гораздо большие количества сульфата и сульфита (в виде таурина), чем морские свинки, высокочувствительные к туберкулезу. У крыс, после заражения микобактериями туберкулеза, этих метаболитов становится еще больше, а у морских свинок – меньше. Высокие концентрации окисленной серы в тканях препятствуют снижению количества железа в тканях зараженных животных и повышают их устойчивость к микобактериям туберкулеза, за счет стимуляции образования в костном мозге предшественников макрофагов-моноцитов и лучшего обеспечения эритроцитов гемоглобином.

**Ключевые слова:** экспериментальный туберкулез, морские свинки и крысы, разная чувствительность к микобактериям туберкулеза, метаболизм железа и серы

## ROLE-SPECIFIC METABOLISM OF IRON AND SULFUR IN INTERSPECIFIC RESISTANCE TO TUBERCULOSIS

<sup>1</sup>Pavlov V.A., <sup>1,2</sup>Kotomtsev V.V., <sup>1</sup>Kravchenko M.A., <sup>1</sup>Megvinski I.D., <sup>1</sup>Sabadash E.V.

<sup>1</sup>Ural'sky Research Institute of the Ministry of Health Phthisiopulmonology,  
Ekaterinburg, e-mail: urniif@urniif.ru;

<sup>2</sup>Institute of Immunology and Physiology, Russian Academy of Sciences SV, Ekaterinburg,  
e-mail: 2134012@gmail.com

It has long been known antimicrobial effect of sulfur oxides, including tuberculosis and Mycobacterium. But how can implement this effect *in vivo* is not known. In our studies found that krys- resistant tuberculosis in the tissues of animals have a much greater amount of sulfate and sulfite (in the form of taurine) than marine svinki-highly sensitive to tuberculosis. In rats after infection with Mycobacterium tuberculosis these metabolites becomes more and marine svinok less. High concentrations of the oxidized sulfur tissues prevent reduction in the amount of iron in the tissues of infected animals and raise their resistance to Mycobacterium tuberculosis by inducing a bone marrow monocyte precursors makrofavog – better ensure erythrocyte hemoglobin.

**Keywords:** experimental tuberculosis, guinea pigs and rats, different sensitivity of Mycobacterium tuberculosis, the metabolism of iron and sulfur

Механизмы естественной устойчивости к туберкулезу остаются во многом не понятны, что не позволяет разработать эффективные средства патогенетической терапии. Особенно это актуально для туберкулеза с лекарственной устойчивостью, при сочетании туберкулеза и ВИЧ инфекции, других тяжелых сопутствующих заболеваний. Тяжелая туберкулезная инфекция сопряжена с прогрессирующим нарастанием свободнорадикальных процессов в пораженных специфическим процессом тканях, чему способствуют нарушения обмена железа и серы, что отмечалось еще в 50–60-х годах прошлого века [3,4]. Но как воздействовать на эти нарушения и в настоящее время во многом не понятно.

Целью наших исследований было сопоставить защитные механизмы с участием

железа и серы в тканях устойчивых и чувствительных к туберкулезу животных.

### Материалы и методы исследования

Опыты проводились на устойчивых к микобактериям туберкулёза (МБТ) крысах, и высокочувствительных к МБТ морских свинок. Животные были взяты из питомника Уральского НИИ фтизиопульмонологии, которые содержались в стандартных условиях вивария согласно принятым требованиям. План эксперимента был рассмотрен и утверждён биоэтической комиссией УНИИФ. Всего в исследованиях было 20 морских свинок (10 опытных и 10 контрольных) и 20 крыс (10 опытных и 10 контрольных) массой 200 – 250 гр. В возрасте 2 – 3 месяца. План эксперимента был рассмотрен и утверждён биоэтической комиссией УНИИФ. Для воспроизведения экспериментального туберкулеза использовали музейный штамм микобактерий Центрального НИИ туберкулеза H37Rv (1993 г.). Морские свинки заража-

лись в паховую складку в дозе 0,001 мг, крысы дозой 0,1 мг 2-недельной живой культурой. Выведение 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. В крови исследовали содержание гемоглобина общепринятым методом.

Костный мозг получали из бедренных костей. Готовили мазки, которые окрашивали по Поппегейму. Клеточность костного мозга определяли на гемоцитометре.

Общее количество железа в исследуемой ткани определяли при помощи атомно-абсорбционного спектрофотометра «Спираль-14» после минерализации ткани при 450 градусах С.

Сульфатную серу в биологическом материале определяли спектрофотометрически с использованием барий-желатинового реактива.

Для биохимических исследований были заморожены образцы сыворотки крови и лейкоцитарной взвеси.

При помощи иммуноферментного анализатора в плазме крови и лейкоцитах исследовали уровень суммарных перекисей липидов (по показателям ОХУСТАТА производства BiomedicaGRUPPE) и стабильных производных (нитрата) оксида азота (RandSystems). При помощи газожидкостной хроматографии на анализаторе ААА 339М «Микротехника» после замораживания тканей в жидком азоте определяли количество свободных аминокислот и глутатиона восстановленного и окисленного, полиаминов.

Для статистической обработки данных использовали непараметрические методы с обработкой полученных данных в программе Excel. Оценка степени достоверности различий между группами оценивалась по критерию «U» Манна-Уитни.

Работа выполнена согласно темам НИОКР УНИ-ИФ Минздрава РФ № 114032140001 и 01201352042 ИИФ УО РАН.

### Результаты исследования и их обсуждение

На момент выведения из эксперимента 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 большей, туберкулезный процесс не развивался.

Исследование крови подопытных животных показало, что у морских свинок генерализация туберкулезного процесса сопряжена с развитием железодефицитной анемии. Так, если в норме гемоглобин в крови морских свинок составлял 149г/л, то через 6 недель после заражения он был равен 78г/л (2-кратное снижение ( $p < 0,01$ )). У крыс уровень гемоглобина был 164 г/л и существенно не менялся после введения им МБТ. На этом фоне в органах менялось содержание железа в тканях. В легком, печени, селезенке, костном мозге морских свинок его количество уменьшалось в 2-3 раза ( $p < 0,01$  во всех случаях). У крыс существенное уменьшение количества железа было только в селезенке - почти в 2 раза ( $p < 0,01$ ). Важнейшим патогенетическим механизмом противостояния МБТ и макроорганизма является борьба за железо. Так, как ион железа необходим для биосинтеза супероксиддисмутазы (СОД) – ключевого фермента МБТ по защите ее от агрессивных радикалов кислорода генерируемых фагоцитами хозяина [3]. Как видим более эффективно это удается крысе, чем морской свинке, хотя и у крысы имеет место отчетливое снижение его количества в селезенке (табл. 1).

Таблица 1

Содержание железа в тканях морских свинок и крыс после заражения МБТ

Ткани животных в которых определялось количество железа (в мкг/г сырого веса ткани)	Группы животных			
	Интактные морские свинки, n = 10	Зараженные МБТ морские свинки, n = 10	Интактные крысы, n = 10	Зараженные МБТ крысы, n = 10
Легкое	140,4±16,9 (80,6–181,3)	91,5±10,2 (53,6–115,1)*	88,7±10,0 (46,4–121,8)	114,1±24,8 (57,2–206,9)
Печень	143,3±21,8 (68,2–206,5)	66,5±7,1 (47,7–95,2)*	62,7±8,2 (33,6–81,3)	62,6±7,5 (40,1–95,3)
Селезёнка	257,6±22,6 (164,8–346,3)	90,8±8,2 (62,5–113,8)*	129,5±28,4 (38,6–188,2)	70,6±22,5 (20,9–180,1)*
Костный мозг	364,2±42,1 (196,8–441,4)	164,5±36, 5(89,8–298,6)*	280,4±31,5 (105,7–376,8)	216,5±37,1 (128,6–365,4)

\* – достоверно отличающиеся от контроля результаты, ( $P < 0,01$ ).

То есть, в любом случае, МБТ влияет на метаболизм железа в организме устойчивых и восприимчивых к туберкулезу животных, но в разной степени. Считается, что защита иона железа от использования его МБТ осуществляется его нитрованием оксидом азота [1].

Нами установлено, что у животных с различной видовой устойчивостью к МБТ генерация высокоактивных соединений азота (ВСА) в организме в ответ на заражение музейным штаммом МБТ – Н37 Rv значительно отличается. Так, у морских свинок количество конечного продукта окисления ВСА – нитрата в плазме крови возрастает после заражения от 56, ±11,2 мкмоль/л в контроле, до 88,8 ±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 большими ресурсами ВСА, о чём говорит 2х-кратное превосходство нитрата в плазме крови этих животных по сравнению с крысами ( $p < 0,01$ ).

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 394,46 ±54,8 мкмоль/л, у зараженных – 609,53±143,40 ( $p < 0,01$ ). У крыс его содержание 145,4±31,6 – 163,8 ± 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 крови контрольных групп животных составила в 2 раза ( $p < 0,01$ ). Но, после заражения МБТ, это различие становится почти 4х кратным. При чем у крыс увеличения показателей оксистата практически не наблюдается, а у морских свинок его уровень резко возрастает почти в 2 раза ( $p < 0,01$ ).

Нитрат является конечным метаболитом ВСА генерируемых эндотелием, фагоцитами, а оксистат – показатель конечных метаболитов превращения свободных радикалов кислорода – перекисей липидов. Эти метаболиты могут выполнять как регуляторно- защитную функцию, так и оказывать повреждающее воздействие на мембраны клеток и ткани при их высоких концентрациях в организме, например, при оксидативном стрессе [1].

Имеются данные, что при большом количестве ионов железа в тканях и низком уровне гидроперекисей в них железо выполняет антиоксидантные функции и на-

оборот- при низком уровне ионов железа и большом количестве гидроперекисей – прооксидантные [6,7]. Таким образом, замыкается порочный круг и МБТ навязывают необходимый им ритм метаболических процессов в макроорганизме, используя при этом его метаболические ресурсы. В частности большое количество железа для биосинтеза, например, антиоксидантного белка-фермента – бактериальной СОД [1,3].

В ферментных системах как макро- так и микроорганизмов железо входит в железосерные комплексы. Поэтому острая борьба между МБТ и организмами подопытных животных разворачивается и за серу. Имеются данные, что у больных туберкулезом людей по мере прогрессирования заболевания с мочой начинает теряться все большее количество серосодержащих аминокислот [8]. Кроме того, есть данные что для МБТ необходимо большое количество тиолов (–SH групп), а вот окисленная сера (ионы  $SO_3$ ,  $SO_4$ ) для них неблагоприятна [2,9].

В наших исследованиях установлено, что после заражения количество сульфата ( $SO_4$ ) в печени морских свинок уменьшается почти в 2 раза с 498,8 мкг/г до 261,9 мкг/г ( $P < 0,01$ ), а у крыс его количество было изначально больше, чем у морских свинок и после заражения еще увеличивается с 1246,4±345,1 мкг/г до 1447,4±276,7 мкг/г ( $P > 0,05$ ). То же самое касается и иона  $SO_3$ , который присутствует в организме в виде таурина ( $NH_2-CH_2-CH_2-SO_3$ ). Количество таурина в печени крыс после введения им МБТ резко увеличивается (с 525,2±28,9 мкг/г до 1657,5±425,1 мкг/г  $P < 0,01$ ) очевидно вследствие его усиленного биосинтеза из цистеина. Следует отметить, что таурина много в тканях крыс, особенно в кроветворных и лимфоидных. Так, в костном мозге крыс содержание таурина составляет 5859,1±620,4 мкг/г а у морских свинок – 468,7±71,1 мкг/г; в селезенке у крыс – 6105,1±245,1 мкг/г, а у морских свинок 902,0±58,1 мкг/г. Разница, как видим, в обоих случаях составляет почти на порядок ( $P < 0,01$ ). В костном мозге заражение МБТ подопытных животных приводит к следующим изменениям. Уровень таурина у крыс изменяется мало, зато увеличивается количество аргинина почти в 3 раза ( $P < 0,01$ ) и метионина от 0 до 51,0 мкг/г. Таурин, аргинин и метионин – метаболиты стимулирующие функционально – метаболическую активность фагоцитов [2, 8, 9, 10] и как установлено в наших исследованиях при увеличении этих метаболитов в костном мозге – у крыс усиливается моноцитарный росток кроветворения (табл. 2).

**Таблица 2**

Содержание свободных аминокислот костного мозга морских свинок и крыс после заражения МБТ (мкг/г ткани)

Название аминокислоты	Группы животных			
	Интактные морские свинки, n = 10	Зараженные МБТ морские свинки, n = 10	Интактные крысы, n = 10	Зараженные МБТ крысы, n = 10
Таурин	486,7±71,1 (345,7–735,6)	1280,4±326,5 (562,9–2546,8)*	5859,1±620,4 (4031,0–9005,0)	4201,6±386,9 (3216,6–5472,8)
Метионин	0	0	«следы»	51,0±5,8(34,2–66,4)*
Глутаминовая кислота	625,0±64,1 (416,2–901,6)	941,4±90,7 (720,8–1628,4)*	1536,±226,8 (865,2–2154,0)	739,3±82,4 (485,1–1156,4)*
Глутамин	246,1±45,7 (86,4–350,2)	216,9±50,3 (157,0–367,5)	497,3±48,7 (363,6–723,8)	274,7±30,1 (192,0–352,8)*
Аргинин	«следы»	0	121,5±26,5 (67,3–225,1)	316,6±41,2 (161,9–395,4)*

\* – достоверно отличающиеся от контроля результаты, (P<0,05).

Результаты наших исследований подтверждают гипотезу что, усиление функционально – метаболических возможностей фагоцитов, очевидно, и препятствует развитию туберкулезного процесса [3,6].

МБТ изгоняются из организма крыс через несколько месяцев после их введения без признаков специфического инфекционного процесса при усилении клеточного звена иммунитета [2,4].

Морские свинки так же пытаются после заражения МБТ увеличить количество таурина в костном мозге (увеличение почти в 3 раза) (P <0,01), но это увеличение все равно далеко не дотягивает до того уровня что имеется у крыс. Кроме того морские свинки увеличивают в костном мозге уровень глутаминовой кислоты и аланина. Но эти метаболиты являются стимуляторами лимфоидного звена кроветворения [10], что очевидно неэффективно при туберкулезной инфекции.

У крыс, напротив, количество глутамата и аланина в костном мозге уменьшается, что в целом свидетельствует о значительно более рациональных защитно-адаптивных перестройках в кроветворных органах и иммунной системе крыс после введения им МБТ, чем у морских свинок. Это положение подтверждается изменениями в ростках кроветворения подопытных животных (табл. 3).

У морских свинок происходит стимуляция гранулоцитарного роста кроветворения тогда, как эритроцитарный, моноцитарный, лимфоцитарный подавляются (во всех случаях P < 0,05). У крыс отмечается отчетливое стимулирование моноцитарного роста. При этом гранулоцитарный и лимфоидный существенных изменений к контролю не проявляют. Обращает на себя внимание, что угнетается эритроцитарный рост кроветворения примерно на 30% (P < 0,05).

**Таблица 3**

Соотношение ростков кроветворения в костном мозге морских свинок и крыс после заражения МБТ ( в % к общему количеству клеток)

Ростки кроветворения	Группы животных			
	Интактные морские свинки, n = 10	Зараженные МБТ морские свинки, n = 10	Интактные крысы, n = 10	Зараженные МБТ крысы, n = 10
Гранулоцитарный	55,2±4,8 (18,0–71,6)	70,8±3,6 (63,4–79,1)*	58,7±5,6 (53,8–82,6)	64,3±7,4 (57,6–70,2)
Эритроцитарный	36,6±3,2 (19,5–44,8)	23,5±2,4 (13,8–28,3)*	20,5±2,4 (16,4–27,2)	14,3±0,8 (11,0–17,0)*
Моноцитарный	1,3±0,3 (0,2–2,0)	0,6±0,1 (0,2–0,8)*	1,0±0,1 (0,4–1,6)	2,5±0,3 (1,4–4,0)*
Лимфоцитарный	12,3±1,4 (7,3–18,0)	5,7±0,6 (3,0–8,8)*	19,0±1,8 (12,0–20,6)	16,5±1,4 (9,0–22,8)

\* – достоверно отличающиеся от контроля (интактные животные) результаты (P<0,05).

У крыс, как мы уже отмечали, после введения им МБТ специфический туберкулезный процесс не развивается, но, тем не менее, борьба с введенными микроорганизмами продолжается и наиболее остро она идет за ресурсы железа и серы. Крысы располагают гораздо большими ресурсами сульфата, в отличие от морских свинок, они имеют более мощную грубоволокнистую соединительную ткань богатую сульфатом [4]. Как видим мобилизация окисленной серы в виде сульфита и сульфата в печени крыс препятствует значительному истощению железа в организме крыс после введения им МБТ. Но, в следствие борьбы с внедрившимися МБТ все же некоторое истощение этих ресурсов наблюдается и у крыс. В частности резкое снижение количества железа в селезенке (табл. 1) и некоторое угнетение образования эритроцитов (табл. 3). Но особенности метаболизма крыс позволяют им резко мобилизовать клеточно-фагоцитарное звено иммунитета и подавить МБТ с последующим их изгнанием из организма.

Ранее мы публиковали сведения о том, что крысы на введение МБТ усиливают биосинтез аскорбиновой кислоты (АК) и таурина в печени [4] с одновременным возрастанием уровня таурина, глутатиона восстановленного, аргинина, активных форм кислорода (АФК) в лейкоцитах и плазме крови. То есть, усиливается метаболическая активность фагоцитов, но их функциональная активность возрастает в меньшей степени. АК, глутатион восстановленный, аргинин и таурин мощные стабилизаторы мембран и антиоксиданты [1,7,8,9] что, очевидно, и позволяет резко усилить генерацию АФК в фагоцитах и уничтожить введенные МБТ на метаболическом уровне без существенного перенапряжения иммунной системы. У морских свинок после заражения отмечается угнетение фагоцитов крови, как на функциональном так и на метаболическом уровне [2,5]. В костном мозге угнетается эритроцитарный и моноцитарный ростки кроветворения усиливается гранулоцитарный. При этом, в кроветворной ткани увеличивается содержание глутаминовой кислоты и аланина. Показательно, что в костном мозге крыс после заражения общая сумма аминокислот уменьшается с 12042,6 мкг/г до 8377,5 мкг/г, тогда как у морских свинок увеличивается с 3066,3 мкг/г до 4089,2 мкг/г. Уровень полиаминов возрастает у первых от 218,4 нмоль/г до 386,5 нмоль/г, а у вторых снижается с 186,4 нмоль/г до 98,5 нмоль/г (во всех перечисленных случаях различие достоверно –  $p < 0,01$ ). Отмеченные различия свидетельствуют о том, что в кроветворной ткани крыс усиливаются ана-

болические процессы, а у морских свинок катаболические.

Ранее мы отмечали, что в печени морских свинок после заражения МБТ содержание АК и таурина уменьшаются, но при этом усиливается образование глутатиона и происходит резкое его окисление [2]. Уровень окисленного глутатиона и оксида азота возрастает в плазме и лейкоцитах крови. Окисленный глутатион, аргинин и оксид азота – мощные стимуляторы апоптоза [3]. Очевидно, апоптоз является главной стратегией защиты морских свинок после заражения их МБТ, но это не спасает морскую свинку от генерализации туберкулезного процесса и скорой гибели, тогда как крысы обеспечивают эффективную перестройку защитно-адаптивных механизмов и изгоняют через несколько месяцев введенные МБТ из организма.

### Заключение

Таким образом можно констатировать тот факт, что ионы железа, серы (сульфат и сульфит), аскорбиновая кислота, таурин, глутатион восстановленный, аргинин, метионин являются факторами повышающими естественную резистентность к туберкулезу в то время как стимуляторы апоптоза- глутатион окисленный, оксид азота, глутамат, аргинин повышают чувствительность организма к туберкулезной инфекции. Различные сочетания метаболитов, повышающих естественную резистентность к МБТ, могут быть использованы в патогенетической терапии туберкулеза.

### Список литературы

1. Голиков П.П. Оксид азота в клинике неотложных заболеваний / П.П. Голиков. – М.: «Медпрактика», 2004. – 214 с.
2. 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.
3. Праскуряков С.Я. Некроз – активная управляемая форма программируемой клеточной гибели / С.Я. Праскуряков, В.Л. Габай, А.Г. Конопляников // Биохимия. – 2002. Том 67. – Вып.4. – С.457-491.
4. Пузик В.И. Проблемы иммуноморфологии туберкулеза / В.И. Пузик. – М.: Медицина. – 1966. – 185с.
5. Сабадаш Е.В. Экспериментальное обоснование применения таурина в терапии туберкулеза / Е.В. Сабадаш: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Екатеринбург, 2006. – 26 с.
6. Сахно Л.В., Леплина О.Ю., Норкин М.Н. и др. Участие оксида азота в развитии инфекционного процесса / Л.В. Сахно, О.Ю. Леплина, М.Н. Норкин // Бюл. экспериментальной медицины. – 2000. – Т.45, № 10. – С.12-14.
7. Gilka M/ The oxidative hypothesis of senescence / M. Gilka, I. Stoian, V. Atanasin, B. Virgolici // J. Postgrad. Med. – 2007. – Vol.53. – P.207-213.
8. Guerra C. Control of Mycobacterium tuberculosis growth by glutathione enhanced natural killer cells / C. Guerra, K. Johal, D. Morris // Clin.and.Immun. – 1012. – Vol.168. – №1. – P. 148-152.
9. Grimble F.R. The effects of sulfur amino acid intake on immune function in human s/ F.R. Grimble // J. Nutr. -2006. – Vol. 136. – №6. – P.1660-1665.
10. Olinto S.C.F. Arginine induces GH gene expression by activating NOS/NO signaling in rat isolated hemi-pituitaries / S.C.F. Olinto, M.G. Adrino, T. Castro-Barbosa // Braz. J. Med. Biol. Res. – 2012. – Vol.45. – №11. – P.1066-1073.