

Застенская И. А.

*Научно-практический центр гигиены,
г. Минск, Беларусь*

Лысенко А. П.

*Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышеслесского,
г. Минск*

Кочубинский В. В.

*Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск*

СТОЙКИЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ ЗАГРЯЗНИТЕЛИ, ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ — ВЛИЯНИЕ НА ТУБЕРКУЛЕЗНУЮ ИНФЕКЦИЮ

Малые дозы хлорорганических соединений, тяжелых металлов и многих других контаминантов окружающей среды влияют на организм, приводя к нарушению функционала и строения [6–8, 10–12]. Соответственно иммуотропные и иммуноксичные химические вещества (ХВ), могут способствовать развитию иммунодефицитов, снижать активность врожденного и приобретенного иммунных ответов [2, 3, 13]. Поиск экспериментального подтверждения этого влияния представляет определенный интерес. Учитывая высокую значимость туберкулезной инфекции (широкое распространение, устойчивость во внешней среде, резистентность к средствам химиотерапии, тенденция к росту заболеваемости) особое значение имеет нормальная иммунореактивность организма человека, так как иммунопатология и вторичные иммунодефициты повышают риск активизации инфекции [1, 5, 9, 13].

Цель работы — определение степени влияния ХВ на течение экспериментальной туберкулезной инфекции у морских свинок.

Материалы и методы. Затравку 14 морских свинок стойкими органическими загрязнителями (тетрахлордифенилоксин (ТХДД), полихлорированные бифенилы (ПХБ), тяжелые металлы) проводили 9 месяцев. При запуске эксперимента возраст животных составлял 1 месяц.

Животных обеих групп содержали в условиях вивария на обычном рационе. ХВ добавляли в пищу опытной группе с индивидуальным контролем поедания пищи каждым животным. Жирорастворимые ХВ (ПХБ28, 52, 101, 138, 153, 209, ТХДД) вводили в рацион с подсолнечным маслом, водорастворимые (ацетат свинца, хлорид кадмия, дихромат калия) — в водном растворе. Затравку проводили 5 дней в неделю. Дозы определяли, исходя из веса животного: металлы в пересчете на ион металла (кадмий — 0,2 мкг/кг/сут, свинец — 1,3 мкг/кг/сут, хром — 0,6 мкг/кг/сут; ТХДД — 1 пг/кг/сут, ПХБ — 20 нг/кг/сут) [4, 7, 8].

После затравки морских свинок подкожно инфицировали суспензией *Mycobacterium bovis* 8 (МБТ) (по 0,1 мг в область паха). Через 30 и 60 суток ставили внутрикожные пробы с туберкулином для млекопитающих (25 и 10 МЕ/0,2 мл) и комплексным аллергеном из атипичных микобактерий (КАМ, Курская биофабрика — -1:200 и 1:400). Интенсивность ответа оценивали по логарифмической

шкале (доза–эффект). На 100 сутки провели аутопсию морских свинок с оценкой морфологических изменений: потеря живой массы — 1 балл, единичные гранулемы — 0,5, увеличение регионарного пахового лимфатического узла — 0,5, при наличии гранулем — 1,5 балла, единичные пузырьки в легких — 1,5, увеличение печени и селезенки — 0,5. Из легких, печени и лимфатического узла, регионарного места введения культуры готовили мазки-отпечатки, которые окрашивали по Циль-Нильсену и конъюгатом пероксидазы и аффинно-очищенных кроличьих IgG к антигенам *M. bovis* (1:100). Субстратом при окрашивании служил диаминобензидин (ДАБ) с перекисью водорода. Для инактивации эндогенной пероксидазы мазки после фиксации обрабатывали 3 % перекисью водорода.

Для бактериологического посева навески легких, печени и лимфатического узла деконтаминировали 4 % серной кислотой и высевали индивидуально в 10 пробирок среды Левенштейна–Иенсена, которые инкубировали при 37 °С. Через 60 суток подсчитывали среднеарифметическое число КОЕ на 1 пробирку.

Результаты и обсуждение. У морских свинок обеих групп через 30 суток после заражения отмечено снижение массы (табл. 1). Через 60 суток морские свинки контрольной группы восстановили общую массу, а у подвергшихся воздействию ХВ она достоверно снизилась.

Таблица 1

Изменение массы морских свинок при экспериментальной туберкулезной инфекции после затравки ХВ

Группы	Групповая живая масса в г (% снижения) после заражения <i>M.bovis</i>			
	До заражения	30 суток	60 суток	90 суток
Контрольная	4942	4468 (−9,6 %)	5197 (+5,2 %)	4082 (−17,4 %)
Опытная	4961	4772 (−3,8 %)	4130 (−13 %)	3933 (−20,7 %)

Через 30 суток после заражения МБТ у морских свинок была поставлена реакция ГЗТ на ППД туберкулина и КАМ. ГЗТ была более выражена у морских свинок, затравленных ХВ (табл. 2).

Таблица 2

ГЗТ к микобактериальным аллергенам у морских свинок с экспериментальной туберкулезной инфекцией на фоне затравки ХВ

Группы	Диаметр папул в мм через 24 ч			
	ППД 25 МЕ	ППД 10 МЕ	КАМ 1:200	КАМ 1:400
Контрольная ^x	13,5 ± 2,6	11,4 ± 2,2	5,4 ± 0,83	4,3 ± 0,32
Опытная	16,4 ± 1,8	13,3 ± 1,4	7,1 ± 1,1	5,1 ± 0,81
Контрольная ^{xx}	14,1 ± 2,1	7,4 ± 1,6	4,3 ± 0,26	4,3 ± 0,26
Опытная ^{xx}	18 ± 2,2	11 ± 2,1	7,2 ± 2,5	4,8 ± 1,0

^x — через 30 суток; ^{xx} — через 60 суток.

При расчете зависимости интенсивности аллергических реакций от логарифма дозы ППД туберкулина расстояние между линиями активности у морских свинок опытной и контрольной группы составило 0,4 lg (рис. 1).

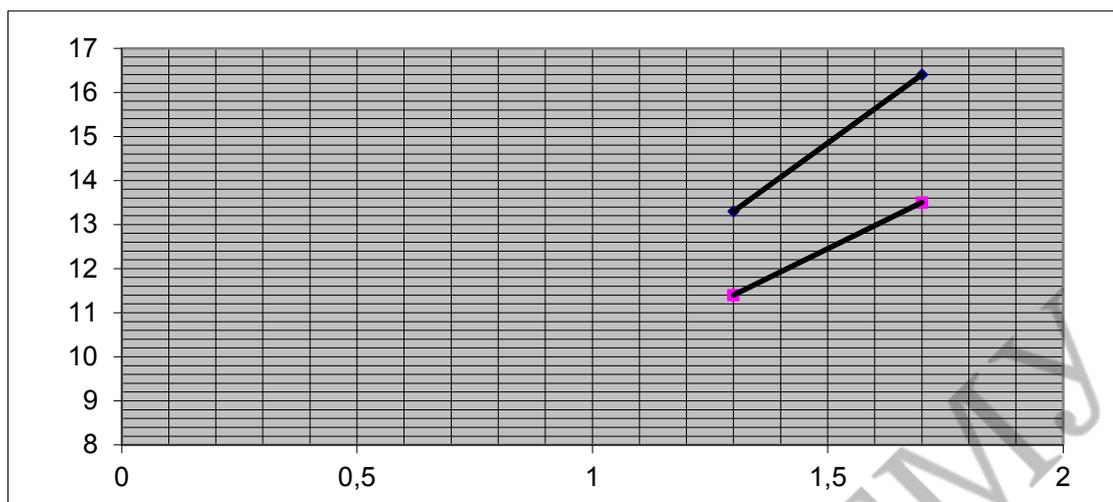


Рис. 1. Зависимость интенсивности ГЗТ к ППД туберкулину от lg его дозы у морских свинок, затравленных ХВ (верхняя линия) и у контрольных животных через 30 суток после заражения (по оси абсцисс — lg дозы туберкулина, по оси ординат — диаметр папул в мм)

$AntiIlg\ 0,4$ составляет 2,51, что указывает на то, что затравленные животные в 2,51 раза интенсивнее реагировали на точно такие же дозы туберкулина, чем особи контрольной группы.

Через 60 суток закономерность сохранилась, хотя разница была не столь значительна. Животные с интоксикацией в 1,78 раза ($antiIlg\ 0,25$) интенсивнее реагировали на ППД туберкулин.

Реакции на КАМ у животных контрольной группы были, практически, ниже критерия положительной оценки. В тоже время у затравленных морских свинок они были положительными.

Результаты аутопсии и бактериологического исследования приведены в табл. 3. Контрольные животные оставались живыми весь срок наблюдения. В опытной группе (интоксикация ХВ) 1 морская свинка (14,3 %) пала через 2 месяца после заражения.

Таблица 3

Результаты аутопсии и бактериологического исследования морских свинок, зараженных *M. bovis* контрольной и опытной групп

Показатель	Контрольная группа	Опытная (затравленные ХВ)
Выжило животных	7	6
Индекс патологических изменений	2,64	3,93
Микроскопия отпечатков из органов (по Циль-Нильсену)	Единичные, рубиново-красные палочки	Многочисленные рубиново-красные палочки
Микроскопия отпечатков из органов (иммуно-пероксидазное окрашивание антителами к <i>M. bovis</i>)	Единичные коричневые палочки, дипло-, тетракокки	Масса коричневых форм
Посев гомогенатов органов на среду Левенштена-Йенсена (КОЕ на пробирку)	10,7	23,8

При аутопсии у морских свинок контрольной и опытной группы отмечены увеличения регионарного месту введения возбудителя пахового лимфатического узла с мелкими гранулами. Изменения в легких, печени, селезенке были в виде единичных гранул с маковое зерно и пузырьков в легких, причем не у всех животных. Средний индекс поражений в контрольной группе составил 2,64, в опытной — 3,93.

Микроскопия мазков-отпечатков из органов (окраска по Цилью-Нильсену) у животных контрольной группы была в большинстве случаев отрицательной.

В мазках-отпечатках из органов животных опытной группы гораздо чаще и в больших количествах обнаруживали рубиново-красные палочки (рис. 2).

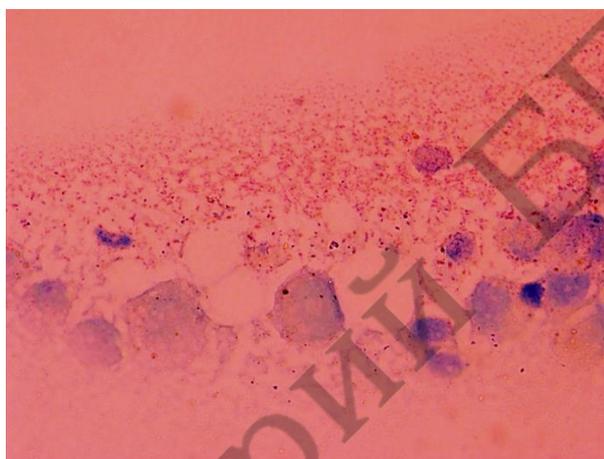


Рис. 2. Отпечаток легкого морской свинки опытной группы. Видны многочисленные рубиново-красные формы МБТ (окраска по Циль-Нильсену, 10 × 100)

При иммунопероксидазном окрашивании отпечатков у животных контрольной группы обнаруживали единичные, специфически окрашенные клетки; у опытной группы — многочисленные участки со специфической коричневой окраской (локализация антигенов *M. bovis*) и макрофаги «набитые» специфически окрашенными клетками МБТ (рис. 3).

При посеве навесок органов на среду Левенштейна–Иенсена среднеарифметическое число выросших КОЕ (на 1 пробирку) было достоверно больше у животных, подвергнутых затравке ХВ (23,8 при 10,7 КОЕ в контрольной группе).

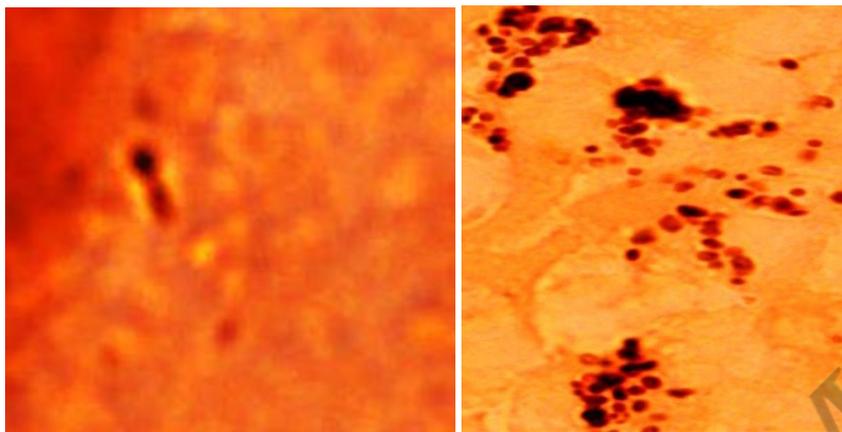


Рис. 3. Иммунопероксидазное окрашивание контрольной морской свинки (слева) и затравленной ХВ (справа; видны многочисленные участки локализации антигенов *M. bovis* (ДАБ, 10×100))

Выбранные условия заражения морских свинок обеспечили возникновение слабо прогрессирующей туберкулезной инфекции без развития значительных туберкулезных изменений, что дало возможность более тонко выявить влияние ХВ на этот процесс.

Известно, что прирост и изменение живой массы — один из объективных показателей состояния здоровья животных. Влияние интоксикации ХВ проявилось тем, что, через 60 суток после заражения у затравленных животных наблюдалась потеря живой массы, в то время как контрольные животные, ее восстановили.

Неожиданным оказалось достоверно более выраженная (в 2,51–1,48 раза) реакция ГЗТ с туберкулином у морских свинок с интоксикацией ХВ, что вероятно связано с усиленным размножением МБТ у таких животных, что подтверждалось микроскопией органов и результатами бактериологического посева.

Установленный факт более выраженной ГЗТ к туберкулину при интоксикации ХВ, вероятно, имеет практическое значение. Известно, что в организм крупного рогатого скота из внешней среды часто попадают нетуберкулезные микобактерии (НТМБ), которые могут стимулировать ГЗТ к туберкулину. Но если это происходит на фоне интоксикации ХВ, интенсивность аллергии может резко возрастать, что приводит к гипердиагностике.

Результаты аутопсии и бактериологического исследования однозначно подтвердили неблагоприятное влияние интоксикации ХВ на течение туберкулезной инфекции, что проявилось гибелью 1 морской свинки (14,3 %) и ростом на 48,8 % индекса поражений, что указывает на то, что использованные ХВ обладают иммунотоксичным эффектом в малых дозах и при хроническом воздействии влияют на механизмы, ограничивающие размножение возбудителя в организме.

В целом, учитывая глобальный рост загрязнения окружающей среды кадмием, свинцом, хромом, ТХДД, ПХБ, можно предположить, что эти токсиканты влияют и на ухудшение эпидемиологической ситуации по туберкулезу.

Выводы. Эксперимент показал, что хроническая интоксикация кадмием, свинцом, хромом, ТХДД, ПХБ в дозах ниже допустимой суточной, вызывает нарушение функционирования иммунной системы, проявляющееся в существен-

ном утяжелении течения туберкулезной инфекции. Моделирование *in vivo* инфекционных процессов целесообразно использовать для выявления скрытых нарушений функций иммунной системы при нормировании химических веществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Земскова, З. С. Скрыто протекающая туберкулезная инфекция / З. С. Земскова, Н. И. Дорожкова. Москва : Медицина, 1984. 221 с.
2. Касохов, Т. Б. Вторичная иммунная и интерфероновая недостаточность у детей при экопатогенном воздействии свинца, кадмия, цинка : автореф. дис. ... д-ра мед наук : 14.00.09 / Т. Б. Касохов ; Северо-Осетин. гос. мед. акад. Москва : [б. и.], 1999. 35 с.
3. Утенин, В. В. Гигиеническая характеристика хрома и бензола и морфофункциональные аспекты их воздействия на организм в условиях эксперимента : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.07, 03.00.25 / В. В. Утенин ; Оренбург. гос. мед. акад. Оренбург : [б. и.], 2002. 24 с.
4. *Assessment of the health risk of dioxins : re-evaluation of the Tolerable Daily Intake (TDI)* / WHO Consultation May 25–29 1998, Geneva, Switzerland. 28 p.
5. What's so special about the developing immune system? / L. A. Burns-Naas [et al.] // *Int. J. of Toxicology*. 2008. N 27(2). P. 223–254.
6. *Chromium* // The UN Environmental progr., the Intern. Labour Org. a. theWHO. Geneva : WHO, 1988. 197 p.
7. *Dietary Supplement. Standart 173. Metal Contaminants Acceptable level*, NSF International. US EPA, 2003. 22 p.
8. *Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a Request from the Commission Related to the Presence of Non-dioxin-like Polychlorinatedbiphenils (PCB) in Feed and Food* // *The EFSA Journal*, 2005. Vol. 284. P. 1–137.
9. *Ecological Pathology of city inhabitants in Lithuania* / R. Ptasekas [et al.] // *Ecologiya*. 2004. N 3. P. 6–16.
10. *Toxiological profile for cadmium* : Research Triangle Inst. Atlanta : U. S. Dep. of Health & Human Services, 1999. 397 p.
11. *Toxicological Profile for Chlorinated Dibenzo-p-Dioxins* : Research Triangle Inst. Atlanta : U. S. Dep. of Health & Human Services, 1998. 678 p.
12. *Toxiological Profile for lead* : Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta, 2007. 528 p.
13. *Wodarz, D. Ecological and evolutionary principles in immunology* / D. Wodarz // *Ecol Lett*. 2006. N 9(6). P. 694–705.