**НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ КЛЕТОК КРОВИ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ
ИЗОНИАЗИДА: ЦИТОЭНЗИМОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА****NON-SPECIFIC RESPONSE OF BLOOD CELLS TO ISONIAZID
ADMINISTRATION: CYTOENZYMOCHEMICAL ASSESSMENT**

**ДОЛГУШИН М.В.
КОЗЛОВ Н.Р.
ИКРАМОВ А.З.**

**DOLGUSHIN M.V.
KOZLOV N.R.
IKRAMOV A.Z.**

*ФГБОУ ВО «Красноярский
государственный медицинский
университет им. проф. В.Ф. Войно-
Ясенецкого» Минздрава России*

*Federal State-Funded Educational Institution
of Higher Education "Prof. V.F. Voino-
Yasensky Krasnoyarsk State Medical
University"*

maxdolg2008@yandex.ru

maxdolg2008@yandex.ru

doi: 10.18411/pivsn-11

idsp: pivsn-11

АННОТАЦИЯ

Оценивали характер морфофункциональной реакции лейкоцитов крови крыс на воздействие изониазида с использованием цитохимических методов исследования. Изониазид (один из основных противотуберкулёзных препаратов) вводили перорально в течение трёх месяцев в терапевтической (5 мг/кг) и токсической (100 мг/кг) дозах. Показано, что изониазид в токсической дозе ингибировал миелопероксидазу, щелочную и кислую фосфатазу в нейтрофилах, кислую фосфатазу и неспецифическую эстеразу в лимфоцитах, но при этом активировал дегидрогеназы в лимфоцитах. Предполагается, что данная реакция клеток крови на изониазид обусловлена способностью данного препарата к функциональной активации коры надпочечников.

Ключевые слова: лейкоциты, метаболизм, цитохимия, изониазид

ABSTRACT

The morpho-functional response peculiarities of the white rat leukocytes to isoniazid (one of the main antituberculosis preparations) were cytoenzymochemical studied. Isoniazid was administrated orally for 3 months in the therapeutic (5 mg/kg) and the toxic (100 mg/kg) doses. Isoniazid in the toxic dose was found to inhibit myeloperoxidase, alkaline and acid phosphatase in the neutrophils, as well as, acid phosphatase and nonspecific esterase in the lymphocytes, but, thereby, it activated dehydrogenases in the lymphocytes. It is suggested that the revealed response of the blood cells to isoniazid is stipulated by the capability of the preparation to activate functionally the adrenal cortex.

Key words: leukocytes, metabolism, cytochemistry, isoniazid.

ВВЕДЕНИЕ

Морфофункциональные исследования клеток крови при воздействии экзогенных факторов направлены на поиск дополнительных маркеров, имеющих отношение к развитию патологических и реактивных состояний. Выраженная лабильность ферментативных процессов в нейтрофилах и лимфоцитах позволяет зафиксировать дифференцированный ответ на разнообразные изменения гомеостаза, что и предопределяет практический интерес к использованию этих клеток в качестве тест-объектов в лекарственной токсикологии.

Лейкоцитарная реакция на введение антибактериальных агентов включает достаточно разнообразный комплекс модификаций, связанных как с прямой, так и опосредованной регуляцией как эффекторного звена иммунитета, так и неспецифической защиты, и, вероятно, оказывающих тем самым определённое влияние на уровень резистентности к возбудителям инфекции [1]. Не исключена и взаимосвязь ферментативных изменений в клетках крови с манифестацией побочных эффектов химиотерапии [2]. При этом экспериментальная оценка особенностей обмена в нейтрофилах и лимфоцитах способствует регистрации дозозависимых сдвигов, отражающих механизмы интоксикации, которые в случае повышенной восприимчивости могут быть реализованы и при менее интенсивной экспозиции, то есть, при стандартных (терапевтических) режимах дозирования.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цель исследования – оценить направленность метаболических изменений в нейтрофилах и лимфоцитах у животных, подвергнутых длительному воздействию изониазида. В настоящее время изониазид относится к числу наиболее распространённых препаратов, применяемых в комплексной химиотерапии туберкулёза, входит в состав многих комбинированных лекарственных средств.

Опыт проводили на белых крысах-самцах, которые были разделены на три группы, одну контрольную и две подопытные. Подопытным животным (2-ой и 3-ей групп соответственно) ежедневно в течение трёх месяцев перорально вводили изониазид в терапевтической (5 мг/кг) или токсической (100 мг/кг) дозах. Контрольные животные вместо препарата получали дистиллированную воду. В контрольную группу входило 10 животных, а в подопытные – по 6.

После завершения воздействия проводили забор крови, готовили мазки, которые были использованы в дальнейшем для цитохимического анализа внутриклеточных метаболических параметров в лейкоцитах крови. Оценивали активность миелопероксидазы (МП) и щелочной фосфатазы (ЩФ) в нейтрофилах, сукцинатдегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и неспецифической нафтол-AS-ацетатэстеразы (НЭ) в лимфоцитах, кислой фосфатазы (КФ) в нейтрофилах и лимфоцитах. Реакцию на МП проводили бензидиновым методом по Сато, на ЩФ и КФ – методом азосочетания по Берстону, на СДГ и ЛДГ – методом с п-нитротетразолием фиолетовым по Р.П. Нарциссову [3]. Результаты реакции на МП, ЩФ и КФ выражали в условных единицах цитохимического индекса, а уровень активности СДГ, ЛДГ и НЭ – в среднем числе гранул продукта реакции в цитоплазме лимфоцита. Полученные данные обрабатывали статистически, достоверность межгрупповых различий цитохимических параметров оценивали при помощи U-критерия (Манна – Уитни).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Введение изониазида в токсической дозе индуцировало комплексную реакцию в нейтрофилах и лимфоцитах крови, затрагивая обменные процессы в различных внутриклеточных структурах (Табл. 1 и 2), тогда как после введения препарата в терапевтической дозе был отмечен единичный метаболический сдвиг в виде активации КФ в лимфоцитах (Табл. 2).

Реакция нейтрофилов на интоксикацию изониазидом проявлялась в существенном угнетении их метаболической активности, при этом ингибирование ферментов (МП, ЩФ и КФ) было достоверным как по отношению к контролю, так и по отношению к животным, получавшим препарат в терапевтической дозе.

Таблица 1

*Изменение активности ферментов в нейтрофилах крыс
при воздействии изониазида*

Показатель	Контроль	Изониазид (терапевтическая доза)	Изониазид (токсическая доза)
Миелопероксидаза (МП)	1,23 ± 0,03	1,31 ± 0,04	1,07 ± 0,03***
Щелочная фосфатаза (ЩФ)	1,97 ± 0,07	1,89 ± 0,05	1,64 ± 0,03***
Кислая фосфатаза (КФ)	0,54 ± 0,04	0,54 ± 0,06	0,35 ± 0,04*#

*Примечание: Показана достоверность различий по отношению к контролю: * $P < 0,01$ и по отношению к группе животных, подвергавшихся воздействию препаратов в терапевтической дозе: # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$.*

Токсические эффекты, отмеченные в лимфоцитах, были связаны с активацией СДГ и ЛДГ с одновременным снижением уровня реакции на гидролитические ферменты (КФ и НЭ). Все выявленные в лимфоцитах ферментативные сдвиги, обусловленные токсической дозой лекарств, также как и в нейтрофилах, показывали статистическую значимость по отношению к контролю и к опытной группе, подверженной влиянию препарата в терапевтической дозе.

Данные, полученные нами в настоящей работе, аналогичны результатам, опубликованным ранее [4,5], в то же время они существенно отличаются от данных, полученных в ходе аналогичных исследований *in vitro*. В этих исследованиях реакция лейкоцитов на изониазид рассматривалась, как правило, в диапазоне концентраций, сопоставимых с таковыми в периферической крови в режиме обычного курса химиотерапии. При этом оценка ферментативного статуса лимфоцитов показывала угнетение СДГ [6], тогда как в нейтрофилах не было выявлено каких-либо ингибирующих эффектов на обменные процессы, наблюдалась активация кислородзависимого метаболизма, что сопровождалось окислением самого препарата при участии МП [7, 8].

Таблица 2

*Изменение активности ферментов в нейтрофилах крыс
при воздействии изониазида*

Показатель	Контроль	Изониазид (терапевтическая доза)	Изониазид (токсическая доза)
Сукцинатдегидрогеназа (СДГ)	13,0 ± 0,6	12,8 ± 0,6	18,5 ± 0,7***
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ)	18,6 ± 0,6	18,2 ± 0,8	23,1 ± 1,6***
Кислая фосфатаза (КФ)	0,51 ± 0,03	0,58 ± 0,03	0,38 ± 0,03*#
Неспецифическая эстераза (НЭ)	8,3 ± 0,5	7,5 ± 0,4	5,6 ± 0,4***

*Примечание: показана достоверность различий по отношению к контролю: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ и по отношению к группе животных, подвергавшихся воздействию препаратов в терапевтической дозе: # $P < 0,01$.*

Отличия отмеченной нами метаболической реакции на изониазид от реакции на данный препарат *in vitro* позволяет предполагать опосредованный характер изменений в клетках крови при введении препарата *in vivo*, учитывая склонность изониазида к стимуляции коры надпочечников [2]. В свою очередь повышенная секреция гормонов коры надпочечников – глюкокортикоидов (ГК) – может индуцировать ингибирование МП, ЩФ и КФ [9], что, по всей видимости, является одним из проявлений мембраностабилизирующих свойств, характерных для ГК. Кроме того, влияние ГК связано не только с угнетением, но и с активацией гидролаз (включая КФ), отражая способность этих гормонов к стимуляции катаболических процессов [10]. Активация СДГ в лимфоцитах также может происходить под влиянием ГК [11], что сопровождается снижением пролиферативной активности этих клеток, индуцированной введением фитогемагглютинин (ФГА). В связи с этим следует

отметить: воздействие изониазида именно *in vivo*, но не *in vitro* вызывает аналогичный ингибирующий эффект на пролиферацию лимфоцитов под влиянием ФГА [12].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, реакция лейкоцитов крови на изониазид связана с дозозависимыми изменениями показателей, отражающих функциональное состояние клетки и её отдельных компартментов. В ходе интоксикации изониазидом происходит угнетение пероксидазы, щелочной и кислой фосфатаз, активация дегидрогеназ. Исходя из характерной для изониазида способности к стимуляции коры надпочечников, можно объяснить индуцированные им метаболические сдвиги усилением влияния глюкокортикоидов.

1. Labro M.-T. Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or "immuno-fairy tales"? // Clin. Microbiol. Rev. – 2000. – Vol. 13, № 4. – P. 615–650.
2. Мишин В.Ю. Медикаментозные осложнения комбинированной химиотерапии туберкулёза лёгких. М.: Изд-во «МИА», 2007. – 248 с.
3. Клиническая цитохимия /Под ред. А.В. Ягоды, Н.А. Локтева. – Ставрополь: Изд-во СтГМА, 2005 – 485 с.
4. Долгушин М.В., Соболев В.Г., Гуцин А.С. Морфофункциональный анализ лейкоцитов крови при воздействии изониазида // Морфология. – 2012. – Т. 142, № 4. – С. 62 – 66.
5. Долгушин М.В., Гуцин А.С., Юшков Г.Г. Влияние изониазида на метаболический статус лимфоцитов и на их склонность к апоптозу, индуцированному гипертермией // Токсикол. вестник. – 2012. – № 5. – С. 11 – 14.
6. Васильева О.А., Уразова О.И., Серебрякова В.А. и др. Оценка влияния противотуберкулёзных препаратов на цитохимический статус лимфоцитов *in vitro* // Проблемы туберкулёза – 2008. – № 3 - С. 27 – 30.
7. Hofstra A.H., Li-Muller S.M., Uetrecht J.P. Metabolism of isoniazid by activated leukocytes. Possible role in drug-induced lupus // Drug Metab. Dispos. – 1992, Vol. 20, № 2. – P. 205 – 210.
8. Okuyan B., Izzettin F.V., Ertaş O. et al. Effect of antituberculosis drugs on human polymorphonuclear leukocyte functions *in vitro* // Int. Immunopharmacol. – 2005. – Vol. 5, № 7-8. – P. 1337 – 1342.
9. Zak K. P., Filatova R.S., Afanasyeva V.V. Cytochemical and ultracytochemical studies of peroxidase activity in rabbit blood granulocytes under hydrocortisone effect. Folia Haematol., 1983, Vol. 110, № 4, P. 490 – 502.
10. Stojek W., Borman A., Glac W. et al. Stress-induced enhancement of activity of lymphocyte lysosomal enzymes in pigs of different stress-susceptibility // J. Physiol. Pharmacol. – 2006 - Vol. 57, Suppl. 8 – P. 61-72.
11. Иващенко Ж.А., Кузнецова О.П., Комиссарова И.А., Калашникова Е.А. Изучение гормоночувствительности у больных гломерулонефритом // Терапевт. архив – 1996, № 6 – С. 13 – 16.
12. Ravn P., Linnet J., Klokke M. et al. Effects of isoniazid treatment on human lymphocyte proliferative response, lymphocyte subsets and natural killer cell activity //Immunopharmacology – 1995 - Vol. 30 (3) - P. 247-253.