

© М. В. Долгушин, В. Г. Соболев и А. С. Гуцин, 2012
УДК 611.018.53

М. В. Долгушин, В. Г. Соболев и А. С. Гуцин

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИЗОНИАЗИДА

Отдел токсикологии (зав. — канд. мед. наук Г. Г. Юшков), Научно-исследовательский институт биофизики, ГУВПО «Ангарская государственная техническая академия» Федерального агентства по образованию

Изучали функционально-метаболические особенности реакции клеток крови крыс на изониазид (один из основных противотуберкулёзных препаратов). Изониазид или его комплекс с пиридоксином вводили перорально в течение 3 мес в терапевтической (5 мг/кг) и токсической (100 мг/кг) дозах (по изониазиду). Показано, что изониазид в токсической дозе ингибировал фагоцитоз и активность миелопероксидазы в нейтрофилах, гидролазы в нейтрофилах и лимфоцитах, но при этом активировал дегидрогеназы в лимфоцитах. Пиридоксин модифицировал токсическое влияние изониазида на метаболические процессы (препятствовал ингибированию фагоцитоза и миелопероксидазы в нейтрофилах, стимулировал активность кислой фосфатазы в лимфоцитах, приводил к снижению содержания лизосомальных катионных белков в нейтрофилах). Предполагается, что выявленная реакция клеток крови на изониазид обусловлена способностью данного препарата к функциональной активации коры надпочечников, а клеточно-метаболические эффекты пиридоксина могут быть связаны с модуляцией действия глюкокортикостероидов.

Ключевые слова: лейкоциты, метаболизм, цитохимия, фагоцитоз, изониазид

Функционально-метаболические изменения в лейкоцитах крови при воздействии химических факторов зависят от патологических и реактивных состояний организма, а также от тяжести интоксикации [2, 5, 9]. Лабильность ферментативных процессов в нейтрофилах и лимфоцитах обуславливает дифференцированный ответ на разнообразные изменения гомеостаза [1, 8], что и предопределяет использование клеток крови в лекарственной токсикологии. В условиях клиники оценка характера обменных сдвигов в лейкоцитах может иметь значение в определении ранних токсических проявлений, способных усиливать побочные эффекты лекарственных средств [6]. В экспериментальных работах лейкоциты крови востребованы при необходимости тестирования сравнительной токсичности препаратов со сходной биологической активностью, а также в ходе выявления механизмов интоксикации, которые в случае повышенной восприимчивости могут быть реализованы и при менее интенсивной экспозиции, т.е., при стандартных (терапевтических) режимах дозирования [2, 15, 17, 19].

Актуальность морфофункциональных исследований клеток крови на изониазид обусловлена, прежде всего, его широким использованием в комплексной химиотерапии туберкулёза. Указанное соединение входит в состав значитель-

ного числа комбинированных противотуберкулёзных препаратов (ПТП). Тем не менее, в настоящее время большинство экспериментальных работ, посвящённых изменениям показателей жизнедеятельности лейкоцитов под влиянием изониазида, выполняются на изолированных клетках (*in vitro*) [2, 15–17], подобные опыты *in vivo* проводятся значительно реже [19]. Однако последние не менее значимы, поскольку позволяют обнаружить внутриклеточные изменения, опосредованные модификациями на уровне системной (общезначимой) регуляции. Исходя из этого, нами была поставлена цель, — изучить направленность функционально-метаболических изменений в лейкоцитах у животных, подвергавшихся продолжительному воздействию изониазида.

Материал и методы. Опыт был выполнен на белых неинбредных крысах-самцах массой 170–230 г, с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к Приказу Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г.). Все животные были разделены на 5 групп, 1 контрольную (n=10) и 4 подопытные (по 7 особей в каждой). Оценивали реакцию лейкоцитов на изониазид, а также на его сочетание с пиридоксином. Совместное назначение этих препаратов в клинической практике продиктовано необходимостью профилактики побочных эффектов изониазида, который может нарушать метаболизм пиридоксина и, тем самым, обострять его дефицит, индуцированный развитием туберкулёза. Животным каждой

Сведения об авторах:

Долгушин Максим Валерьевич (e-mail: maxdolg2008@yandex.ru), Соболев Виктор Григорьевич, Гуцин Александр Сергеевич, отдел токсикологии, Научно-исследовательский институт биофизики, ГУВПО «Ангарская государственная техническая академия», 665830 Иркутская область, Ангарск, а/я 4380

из подопытных групп ежедневно в течение 3 мес перорально вводили один из препаратов — изониазид или изовит (изониазид+пиридоксин) в одной из доз (терапевтической или токсической). Терапевтическая доза составляла 5 мг/кг, а токсическая — 100 мг/кг (по изониазиду). Контрольные животные вместо препаратов получали дистиллированную воду. Препараты, которые применялись в опыте, были предоставлены ОАО «Фармасинтез» (Россия). При завершении срока введения ПТП брали кровь, которую использовали для приготовления мазков и оценки фагоцитарной активности нейтрофилов. Мазки крови были взяты для цитохимического выявления миелопероксидазы (МПО), щелочной фосфатазы (ЩФ) и лизосомальных катионных белков (КБ) в нейтрофилах, сукцинатдегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и неспецифической нафтол-AS-ацетатэстеразы (НЭ) в лимфоцитах, кислой фосфатазы (КФ) в нейтрофилах и лимфоцитах. Постановку реакции на МПО осуществляли бензидиновым методом по Сато [7], на ЩФ и КФ — методом азосочетания по Берстону [10], на КБ — методом с бромфеноловым синим по М. Г. Шубичу [7], на СДГ и ЛДГ — по Р. П. Нарциссову [5], на НЭ — методом азосочетания по Лёффлеру [7]. В ходе приготовления инкубационных сред были использованы реактивы фирм «Sigma» (США), «Reanal» (Венгрия) и «Serva» (Германия). Результаты определения активности СДГ, ЛДГ и НЭ выражали средним числом гранул продукта реакции в цитоплазме лимфоцита, а уровень внутриклеточных реакций на МПО, ЩФ, КФ и КБ — в условных единицах среднего цитохимического коэффициента (СЦК). Расчёт СЦК проводили по Karpow, для этого визуально оценивали показатель интенсивности окрашивания цитоплазмы по пятибалльной шкале (от 0 до 4), затем вычисляли сумму произведений числа клеток определённой группы на показатель интенсивности, с последующим делением на общее количество просмотренных клеток [1, 7]. Фагоцитарную активность определяли с использованием частиц латекса, представляя результаты как долю нейтрофилов (в процентах), обладающих поглотительной способностью (фагоцитарное число), а также как среднее количество поглощенных частиц в пересчёте на одну клетку (фагоцитарный индекс) [9]. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием U-критерия Манна—Уитни.

Результаты исследования. Интоксикация лекарственными препаратами индуцировала комплексную реакцию в лейкоцитах крови, затрагивая обменные процессы в различных внутриклеточных структурах, тогда как после введения ПТП в терапевтических дозах метаболические изменения были весьма незначительными, ограничиваясь показателями активности гидролитических ферментов (табл. 1, 2).

Влияние изониазида в терапевтической дозе стимулировало активность КФ в лимфоцитах, а в сочетании с пиридоксином (в виде изовита) приводило к статистически значимому снижению активности ЩФ в нейтрофилах при параллельной тенденции к уменьшению активности КФ. Данный метаболический сдвиг в нейтрофильных гранулоцитах сохранялся и после воздействия изовита в более высокой, токсической дозе. Реакция этих клеток на интоксикацию, вызванную изолированным введением изониазида, проявлялась существенным угнетением функционально-метаболической активности, при этом ингибирование ферментов (МПО, ЩФ и КФ) и фагоцитарной способности было значимым по сравнению, как с контролем, так и с показателями у животных, получавших препарат в терапевтической дозе. В случае совместного введения изониазида и пиридоксина токсическое влияние на нейтрофилы не сопровождалось ингибированием МПО и фагоцитоза, единственный внутриклеточный сдвиг, значимый не только по сравнению с контролем, но и с показателями у животных, подвергавшихся воздействию в терапевтической дозе, заключался в снижении содержания КБ.

Метаболические эффекты интоксикации, отмеченные в лимфоцитах, были практически

Таблица 1

Функционально-метаболические показатели в нейтрофилах периферической крови крыс при воздействии изониазида ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Исследованный показатель	Контроль	Изониазид		Изониазид+пиридоксин (изовит)	
		Терапевтическая доза	Токсическая доза	Терапевтическая доза	Токсическая доза
Активность:					
МПО	1,21±0,03	1,16±0,03	1,0±0,6* ^{##}	1,38±0,08	1,26±0,04
ЩФ	1,93±0,07	1,87±0,08	1,49±0,05* ^{##}	1,35±0,04*	1,40±0,06*
КФ	0,54±0,04	0,53±0,06	0,36±0,03* ^{##}	0,39±0,05	0,38±0,05
Содержание КБ	0,76±0,05	0,77±0,05	0,75±0,04	0,70±0,05	0,26±0,05* ^{##}
Фагоцитарное число (ФЧ)	64,3±2,6	57,0±2,9	44,8±2,2* [#]	64±5	4±5
Фагоцитарный индекс (ФИ)	1,94±0,08	1,84±0,07	1,68±0,09	1,91±0,06	1,96±0,08

Примечание. МПО — миелопероксидаза; ЩФ — щелочная фосфатаза; КФ — кислая фосфатаза; КБ — катионный белок. Результаты оценки содержания МПО, ЩФ, КФ и КБ представлены в условных единицах среднего цитохимического коэффициента; ФЧ выражено в процентах нейтрофилов, содержащих частицы латекса, а ФИ — в количестве частиц латекса на клетку.

Различия значимы: * по сравнению с контролем при $P < 0,01$; по сравнению с показателями в группе животных, подвергавшихся воздействию препаратов в терапевтической дозе: # при $P < 0,05$; ## при $P < 0,01$.

Таблица 2

Активность ферментов в лимфоцитах периферической крови крыс при воздействии изониазида ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Исследованные ферменты	Контроль	Изониазид		Изониазид+пиридоксин (изовит)	
		Терапевтическая доза	Токсическая доза	Терапевтическая доза	Токсическая доза
СДГ	12,9±0,5	13,2±0,7	19,7±0,7**##	12,8±1,2	17,5±0,8**##
ЛДГ	18,1±1,1	17,9±1,4	24,7±2,0**.#	19,3±0,8	24,9±0,9**##
КФ	0,51±0,03	0,61±0,03*	0,36±0,05*##	0,52±0,03	0,690±0,020**##
НЭ	7,2±0,3	7,5±0,4	4,60±0,20**##	7,2±0,4	4,5±0,6**##

Примечание. СДГ — сукцинатдегидрогеназа; ЛДГ — лактатдегидрогеназа; КФ — кислая фосфатаза; НЭ — неспецифическая нафтол-AS-ацетатэстераза. Результаты оценки активности СДГ, ЛДГ и НЭ представлены средним числом гранул продукта реакции на клетку; показатели активности КФ — в условных единицах среднего цитохимического коэффициента.

Различия значимы: по сравнению с контролем: * при $P < 0,05$; ** при $P < 0,01$; по сравнению с показателями в группе животных, подвергавшихся воздействию препаратов в терапевтической дозе: # при $P < 0,05$; ## при $P < 0,01$.

одинаковыми вне зависимости от вводимого препарата. При этом наблюдалась активация СДГ и ЛДГ с одновременным снижением уровня НЭ (см. табл. 2). Различия касались лишь направленности изменения активности КФ: ингибирование данного фермента происходило после изолированного введения изониазида, а стимуляция — после введения изовита. Все выявленные в лимфоцитах ферментативные сдвиги, обусловленные токсической дозой лекарств, были статистически значимы по сравнению с контролем и с показателями в группе животных, подвергнутых влиянию соответствующего препарата в терапевтической дозе.

Обсуждение полученных данных. Внутриклеточные изменения, представленные в настоящей работе, можно лишь условно сравнить с результатами 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 [2], тогда как в нейтрофилах не было выявлено каких-либо ингибирующих влияний на фагоцитарную активность и на обменные процессы [15, 17]. Воздействие изониазида на нейтрофилы, стимулированные *in vitro*, приводило к активации кислородзависимого метаболизма [15], который в данных условиях проявлял способность к окислению самого препарата при участии МПО и перекиси водорода [16].

Реактивные особенности лейкоцитов, обнаруженные ранее *in vitro*, существенно отличаются от морфофункциональных изменений, отмеченных нами при субхроническом введении изониазида в токсической дозе, т.е., включающих угнетение

МПО и фагоцитарной активности в сочетании со стимуляцией СДГ. Это позволяет предположить опосредованный характер продемонстрированных здесь метаболических эффектов изониазида *in vivo*, учитывая к тому же весьма низкую способность гранулоцитов крови, не подвергнутых стимуляции, к поглощению данного препарата [18]. Одним из механизмов, опосредующих выявленные метаболические сдвиги, можно считать усиление влияния эндогенных кортикостероидов, исходя из отчетливо выраженной склонности изониазида к стимуляции коры надпочечников [5].

Феноменологические проявления регуляции морфофункционального состояния лейкоцитов глюкокортикостероидами (ГК) в общих чертах достаточно хорошо изучены. Установлено ингибирующее влияние ГК на МП и фагоцитарную активность нейтрофилов [13, 21]. Показано снижение интенсивности реакции на гидролазы (в том числе на ЩФ и КФ), что рассматривается как проявление мембраностабилизирующих свойств, характерных для ГК [6]. Однако под влиянием этих гормонов может происходить и активация КФ, так же как и других лизосомальных гидролаз в лимфоцитах [6, 20], отражая, тем самым, один из механизмов действия ГК на лимфоидную ткань — стимуляцию катаболических процессов. Вероятно, именно с данным механизмом связано и более интенсивное расходование энергетических субстратов, что проявляется возрастанием активности дегидрогеназ. При этом активация СДГ в лимфоцитах крови может сопровождаться проявлением способности ГК угнетать их пролиферацию, индуцированную фитогемагглютинином (ФГА), тогда как в случае снижения активности СДГ при контакте с ГК реакция лимфоцитов крови на ФГА оказывается гормонорезистентной

[4]. Введение изониазида *in vivo* также уменьшает пролиферативный ответ лимфоцитов, индуцированный ФГА, данный ингибирующий эффект не наблюдается *in vitro* и не подвергается модификации пиридоксином [19]. В нашем опыте степень влияния пиридоксина на метаболический статус лимфоцитов была аналогичной, поскольку большинство ферментативных изменений, вызванных изониазидом, имело место и при воздействии изовита. В то же время, полученные нами результаты свидетельствуют о значительно большей восприимчивости нейтрофилов к модулирующему действию пиридоксина, чем лимфоцитов. Реакция нейтрофилов на изониазид после его изолированного введения в токсической дозе или совместно с пиридоксином имела сходство лишь в направленности изменения активности ЩФ (в сторону уменьшения) и, кроме того, причины, вызывающие такой метаболический сдвиг в каждом из этих двух случаев, по всей вероятности, были различными. Можно предположить, что снижение активности ЩФ после сочетанного влияния изониазида и пиридоксина было обусловлено не мембранной стабилизацией, а дозозависимой стимуляцией экзоцитоза, который при более интенсивном воздействии, очевидно, включал в себя и снижение содержания КБ. Как известно, МПО и КФ локализованы в азурофильных гранулах, а КБ входят в состав не только азурофильных, но и специфических гранул. Реализация экзоцитоза в нейтрофилах затрагивает, прежде всего, содержимое специфических гранул, тогда как азурофильные гранулы в этом отношении менее мобильны [1]. В свою очередь, отмечается обратная зависимость между степенью дегрануляции в нейтрофилах крови и уровнем эндогенных влияний ГК [12, 14]. Все эти обстоятельства позволяют рассматривать выявленные нами особенности клеточного ответа на пиридоксин во взаимосвязи с антиглюкокортикоидными свойствами последнего. Показано, что повышенные концентрации пиридоксина могут влиять на эффекты стероидных гормонов, существенно ингибируя транскрипционную активность, опосредованную внутриклеточными рецепторами ГК, не оказывая при этом действия на независимую от стероидных гормонов генную экспрессию [11]. Возможно, именно подобный способ регуляции обеспечивает избирательность модулирующих влияний пиридоксина, поскольку ряд физиологических эффектов ГК (включая связывание последних с митохондриями), по всей видимости, реализуются и без предварительного образования комплекса с внутриклеточными рецепторами, т.е. не опосредуются изменениями на уровне белкового синтеза [3, 4].

Таким образом, реакция лейкоцитов крови на изониазид при его изолированном воздействии или введении в сочетании с пиридоксином связана с дозозависимыми изменениями показателей, отражающих функциональное состояние клетки и её отдельных компартментов. В ходе интоксикации изониазидом происходит угнетение фагоцитоза и МПО, снижение активности гидролаз, стимуляция дегидрогеназ. При этом дополнительное введение пиридоксина частично модифицирует токсическое влияние изониазида на метаболические процессы в клетках крови (стимулирует активность КФ в лимфоцитах, препятствует ингибированию фагоцитоза и пероксидазы в нейтрофилах, приводит к снижению в них содержания КБ). Исходя из характерной для изониазида способности к активации коры надпочечников, можно объяснить индуцированные им метаболические сдвиги усилением глюкокортикоидных влияний, а избирательное действие пиридоксина — свойством данного препарата модулировать эффекты стероидных гормонов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев Н. А. Клинические аспекты лейкопений, нейтропений и функциональных нарушений нейтрофилов. СПб., Фолиант, 2002.
2. 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.
3. Духанин А. С., Станкевич Л. И. и Петрова М. П. Влияние кортизола и коклюшного токсина на уровень цАМФ в лимфоцитах человека. Бюл. exper. биол., 1995, т. 119, № 2, с. 171–173.
4. Иващенко Ж. А., Кузнецова О. П., Комиссарова И. А. и Калашникова Е. А. Изучение гормоночувствительности у больных гломерулонефритом. Тер. арх., 1996, № 6, с. 13–16.
5. Мишин В. Ю. Медикаментозные осложнения комбинированной химиотерапии туберкулёза лёгких. М., Медицинское информационное агентство, 2007.
6. Панин Л. Е. и Маянская Н. Н. Лизосомы. Роль в адаптации и восстановлении. Новосибирск, Наука, 1987.
7. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования. Под ред. Е. А. Кост. М., Медицина, 1975.
8. Труфакин В. А., Шурлыгина А. В. и Робинсон М. В. Функциональная морфология клеток иммунной системы в эксперименте и клинике. Морфология, 2005, т. 128, вып. 4, с. 20–24.
9. Хаитов Р. М., Пинегин Б. В. и Истамов Х. И. Экологическая иммунология. М., ВНИРО, 1995.
10. Хейхоу Ф. Г. Дж. и Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. М., Медицина, 1983.
11. Allgood V. E. and Cidlowski J. A. Vitamin B6 modulates transcriptional activation by multiple members of the steroid hormone receptor superfamily. J. Biol. Chem., 1992, v. 267, № 6, p. 3819–3824.

12. Bishop N. C., Blannin A. K., Walsh N. P. and Gleeson M. Carbohydrate beverage ingestion and neutrophil degranulation responses following cycling to fatigue at 75% VO_2 max. *Int. J. Sports Med.*, 2001, v. 22, № 3, p. 226–231.
13. Dahanukar S. A., Thatte U. M., Deshmukh U. D. et al. The influence of surgical stress on the psychoneuro-endocrine-immune axis. *J. Postgrad. Med.*, 1996, v. 42, № 1, p. 12–14.
14. Davison G. and Gleeson M. Influence of acute vitamin C and/or carbohydrate ingestion on hormonal, cytokine, and immune responses to prolonged exercise. *Int. J. Sport. Nutr. Exerc. Metab.* 2005, v. 15, № 5, p. 465–479.
15. Demkow U., Malkowska-Zwierz W., Rogala E. et al. Effect of antituberculosis drugs, isoniazid, pyrazinamide and rifampicin, on chemiluminescence of the human polymorphonuclear leukocytes. *Folia Biol.*, 1995, v. 41, № 5, p. 257–262.
16. Hofstra A. H., Li-Muller S. M. and Uetrecht J. P. Metabolism of isoniazid by activated leukocytes. Possible role in drug-induced lupus. *Drug Metab. Dispos.*, 1992, v. 20, № 2, p. 205–210.
17. Okuyan B., Izzettin F. V., Ertaş O. et al. Effect of antituberculosis drugs on human polymorphonuclear leukocyte functions *in vitro*. *Int. Immunopharmacol.*, 2005, v. 5, № 7-8, p. 1337–1342.
18. Prokesch R. C. and Hand W. L. Antibiotic entry into human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1982, v. 21, № 3, p. 373–380.
19. Ravn P., Linnet J., Klokke M. and Pedersen B. K. Effects of isoniazid treatment on human lymphocyte proliferative response, lymphocyte subsets and natural killer cell activity. *Immunopharmacology*, 1995, v. 30, № 3, p. 247–253.
20. 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, v. 57, Suppl. 8, p. 61–72.
21. Zak K. P., Filatova R. S. and Afanasyeva V. V. Cytochemical and ultracytochemical studies of peroxidase activity in rabbit blood granulocytes under hydrocortisone effect. *Folia Haematol.*, 1983, v. 110, № 4, p. 490–502.

Поступила в редакцию 16.01.2012

MORPHO-FUNCTIONAL ANALYSIS OF BLOOD LEUKOCYTES AFTER ISONIAZID ADMINISTRATION

M. V. Dolgushin, V. G. Sobolev and A. S. Gushchin

The functional-metabolic response peculiarities of the rat blood cells to isoniazid (one of the main antituberculosis medications) were studied. Isoniazid or its complex with pyridoxine were administrated orally for 3 months in therapeutic (5 mg/kg) and the toxic (100 mg/kg) doses (based on isoniazid). Isoniazid in toxic dose was found to inhibit the phagocytosis and the myeloperoxidase activity in neutrophils, the hydrolase activity in neutrophils and lymphocytes, but, at the same time, it activated dehydrogenase activity in lymphocytes. Pyridoxine modified the toxic effect of isoniazid on the metabolic processes (prevented the inhibition of phagocytosis and peroxidase activity in neutrophils, stimulated acid phosphatase activity in lymphocytes, decreased in the level of the lysosomal cationic proteins in neutrophils). It is suggested that the response of the blood cells to isoniazid, demonstrated in this work, was caused by the capacity of the medication to functionally activate the adrenal cortex, while the cellular-metabolic effects of pyridoxine could be associated with the modulation of glucocorticosteroid activity.

Key words: *leukocytes, metabolism, cytochemistry, phagocytosis, isoniazid*

Departament of Toxicology, Research Institute of Biophysics, Angarsk State Technical Academy