

УДК 613.644: 612.014.1
©Долгушин, Давыдова

ВЛИЯНИЕ ВИБРАЦИОННОГО СТРЕССА НА ФУНКЦИОНАЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ СТАТУС ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ

М.В. Долгушин^{1}, Н.С. Давыдова²*

¹Научно-исследовательский институт биофизики ГУВПО Ангарской государственной технической академии Федерального агентства по образованию РФ, 665830, Иркутская обл., г. Ангарск, ул. Партизанская, 2, а/я 4380; тел.: (8-395-5) 95-70-68; тел./факс: (8-395-5) 95-70-62; эл. почта: maxdolg2008@yandex.ru

²Ангарский филиал УРАМН Восточно-Сибирского научного центра экологии человека Сибирского отделения РАМН – НИИ медицины труда и экологии человека

Хронический стресс, индуцированный воздействием общей вибрации на белых крыс, приводил к существенным изменениям в функционально-метаболическом статусе клеток крови, затрагивая уровень фагоцитоза и лизосомальных катионных белков в нейтрофилах, состояние окислительных и гидролитических процессов в нейтрофилах и лимфоцитах. Все определяемые внутриклеточные параметры проявляли дифференцированную реакцию на стресс, а также на дополнительное сочетанное введение антиоксидантов (глицина и α -токоферола ацетата).

Ключевые слова: лейкоциты, метаболизм, цитохимия, фагоцитоз, вибрационный стресс, антиоксиданты.

ВВЕДЕНИЕ. Метаболические изменения в лейкоцитах крови обладают способностью отражать регуляторные эффекты, затрагивающие иммунные и неспецифические защитные функции организма, и в связи с этим могут представлять определенный интерес в ходе рассмотрения особенностей влияния стрессовых факторов.

Целью настоящей работы явилось изучение характера клеточного обмена в нейтрофилах и лимфоцитах при вибрационном стрессе, который является достаточно распространённым в современных условиях.

* - адресат для переписки

Исследования клеточно-метаболического звена в системной реакции крови на вибрационное воздействие связаны с выявлением ранних (предпатологических) сдвигов в организме, поиском эффективных антистрессорных препаратов (и их комбинаций), что, прежде всего, базируется на оценке состояния окислительных и гидролитических процессов, играющих существенную роль в реализации адаптивных механизмов [1-4]. Исходя из этого нами был проведен анализ метаболических сдвигов в лейкоцитах у животных, подвергавшихся комбинированному влиянию вибрации и адаптогенных средств, в качестве которых применяли глицин и α -токоферола ацетат, обладающие антиоксидантными и мембрано-стабилизирующими свойствами.

МЕТОДИКА. В исследовании были использованы белые неинbredные крысы-самцы массой 190–240 г, содержащиеся в стандартных условиях вивария. Все крысы были разделены на три группы, по 8 особей в каждой, группа 1 была контрольной, остальные две – опытными. Животных из опытных групп подвергали воздействию общей вибрации, согласно условиям, предложенным ранее: в течение 30 дней, частота 32 Гц, ускорение 50 м/с² [5], при этом продолжительность ежедневного контакта с вибрацией была увеличена до 4-х ч. Для крыс из группы 2 влияние вибрации было изолированным, а животным из группы 3 ежедневно перед помещением на виброустановку вводили препараты, обладающие антиоксидантным действием: глицин (внутрижелудочно, в дозе 10 мг/кг) и α -токоферола ацетат (внутрибрюшинно, в дозе 100 мг/кг). На следующий день после прекращения воздействия забирали образцы крови для дальнейшей оценки фагоцитарной активности нейтрофилов, а также для цитохимического тестирования метаболических показателей в нейтрофилах и лимфоцитах после приготовления мазков. Уровень фагоцитарной реакции выражали в процентах клеток, способных к поглощению латекса, а также в виде фагоцитарного индекса, то есть, в среднем числе частиц латекса на одну фагоцитирующую клетку [6]. В ходе цитохимического исследования определяли активность миелопероксидазы (МП), щелочной фосфатазы (ЩФ) и содержание лизосомальных катионных белков (ЛКБ) в нейтрофилах, активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и неспецифической (нафтол-AS-ацетат) эстеразы (НЭ) в лимфоцитах, уровень кислой фосфатазы (КФ) в нейтрофилах и лимфоцитах. Активность гидролаз (ЩФ, КФ и НЭ) оценивали методом одновременного азосочетания [7], активность МП – бензидиновым методом [8], активность дегидрогеназ – по методу Р.П. Нарциссова [8, 9], содержание ЛКБ – по методу М.Г. Шубича [8]. Активность СДГ, ЛДГ и НЭ выражали количественно, в среднем числе гранул продукта реакции на клетку, а уровень МП, ЩФ, КФ и КБ – полуколичественно, в условных единицах среднего цитохимического коэффициента (СЦК) по L. Karlow [8]. Параллельно учитывали общее число лейкоцитов, а также процентное и абсолютное содержания нейтрофилов и лимфоцитов в крови, применяя окраску мазков по Романовскому. Полученные данные оценивали статистически с использованием критерия Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Влияние вибрационного стресса было отмечено нами по отношению ко всем внутриклеточным параметрам, тогда как показатели, отражающие клеточно-популяционный уровень реактивности, оставались без изменений, демонстрируя устойчивость к экстремальному воздействию (табл. 1). При этом имели место выраженные отличия функционально-метаболических сдвигов в нейтрофилах у животных

двух опытных групп, поскольку нормализующего эффекта антиоксидантов (АО) не наблюдалось только по отношению к содержанию ЛКБ (табл. 2). В наибольшей степени АО повлияли на активность МП и способность нейтрофилов к фагоцитозу (приводя к достоверному возрастанию их уровня, тогда как при изолированном воздействии вибрации направленность изменения была противоположной). Индуцированная вибрацией стимуляция гидролаз в нейтрофилах при дополнительном введении адаптогенов также претерпевала определённые изменения: в группе 3 происходило уменьшение активности этих ферментов по сравнению с животными группы 2.

Таблица 1. Количественные показатели лейкоцитов, нейтрофилов и лимфоцитов в периферической крови у подопытных крыс.

Группа животных	Лейкоциты ($\times 10^9/\text{л}$)	Сегментоядерные нейтрофины		Лимфоциты	
		(%)	($\times 10^9/\text{л}$)	(%)	($\times 10^9/\text{л}$)
1. Контроль	12,9\pm1,2	12,4\pm2,5	1,6\pm0,5	64,8\pm4,2	8,3\pm0,8
2. Вибрация	14,2\pm0,8	12,2\pm1,3	1,7\pm0,2	58,0\pm4,1	8,1\pm0,3
3. Вибрация + АО	14,7\pm1,1	11,0\pm2,0	1,8\pm0,5	68,7\pm3,4	9,8\pm1,1

Примечание: Здесь и в таблицах 2-3 результаты представлены в виде средней величины \pm ошибка средней. АО - антиоксиданты.

Таблица 2. Особенности функционально-метаболических изменений в нейтрофилах периферической крови крыс при воздействии вибрации.

Показатель	Группа 1 (контроль)	Группа 2 (вибрация)	Группа 3 (вибрация + антиоксиданты)
Миелопероксидаза	1,57\pm0,04	1,38\pm0,07*	1,75\pm0,03***##
Кислая фосфатаза	0,36\pm0,04	0,75\pm0,03**	0,58\pm0,06**#
Щелочная фосфатаза	2,23\pm0,11	3,27\pm0,16**	2,58\pm0,16#
Катионный белок	0,85\pm0,05	0,49\pm0,09**	0,61\pm0,05*
Фагоцитоз (%)	21,7\pm1,0	14,6\pm1,1*	35,7\pm2,3***##
Фагоцитарный индекс	1,77\pm0,16	1,80\pm0,23	1,96\pm0,09

Примечание: Показана достоверность изменений по отношению к контролю (* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$) и по отношению к группе 2 (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$). Показатели активности МП, ЩФ, КФ и ЛКБ представлены в единицах СЦК, а уровень ФИ - в среднем числе частиц латекса на клетку.

Лимфоциты животных, входящих в различные опытные группы, демонстрировали сходную реакцию гидролитических ферментов (активацию КФ и торможение НЭ), эффект АО проявлялся лишь по отношению к дегидрогеназам (табл. 3). Влияние вибрации (группа 2) сопровождалось стимуляцией СДГ и ЛДГ, однако при дополнительном введении адаптогенов (группа 3) уровень ЛДГ достоверно снижался по отношению к контролю, а уровень СДГ – по отношению к животным из группы 2.

ВЛИЯНИЕ СТРЕССА НА ЛЕЙКОЦИТЫ КРОВИ

Таблица 3. Изменения активности ферментов в лимфоцитах периферической крови крыс при воздействии вибрации.

Показатель	Группа 1 (контроль)	Группа 2 (вибрация)	Группа 3 (вибрация + антиоксиданты)
Сукцинатдегидрогеназа	8,2 ± 0,5	15,7 ± 1,2**	11,8 ± 0,9**#
Лактатдегидрогеназа	17,1 ± 1,0	22,1 ± 1,1**	11,1 ± 0,6**##
Кислая фосфатаза	0,38 ± 0,05	0,55 ± 0,05*	0,53 ± 0,06*
Неспецифическая эстераза	16,8 ± 0,5	12,3 ± 0,7**	12,1 ± 0,6**

Примечание: Показана достоверность изменений по отношению к контролю (* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$) и по отношению к группе 2 (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$). Результаты цитохимической оценки СДГ, ЛДГ и НЭ выражены в среднем числе гранул на клетку, а результаты оценки КФ - в единицах СЦК.

Изменения численности и клеточно-популяционного состава (формулы) лейкоцитов периферической крови не относятся к признакам, характерным для продолжительного стрессирования, поскольку могут отсутствовать у людей и экспериментальных животных как на первичном (мобилизационном) этапе действия раздражителя, так и на более поздних этапах реагирования [10, 11]. В то же время в самих циркулирующих лейкоцитах и плазме крови начальные проявления повреждающей реакции на экзогенные воздействия связаны с закономерным сдвигом в сторону повышенного образования активных форм кислорода (АФК), способствующих пероксидации мембранных липидов [12-15]. Используя в качестве повреждающих агентов факторы химической природы, было выявлено, что ингибирование МП при параллельной активации КФ в нейтрофилах также имеет отношение к свободнорадикальному механизму, показывая зависимость от скорости накопления АФК в периферической крови: прямую – для КФ, и обратную – для МП [12, 13]. Кроме того, в момент фиксации вышеуказанного разнонаправленного изменения в активности МП и КФ обнаруживалось усиление спонтанной генерации АФК и в самих нейтрофилах [16, 17], при этом уровень продукции АФК, обусловленный липополисахаридной стимуляцией, оставался прежним, свидетельствуя о потенциальном ослаблении внутриклеточных функциональных резервов [16]. В таком случае активация МП и фагоцитоза при сочетанном воздействии вибрации и АО (группа 3) может отражать обратный процесс, свойственный истинной адаптации и связанный с исполнением повышенных функциональных запросов клетки, тогда как отмеченная параллельно несколько меньшая активность гидролитических ферментов в нейтрофилах, вероятно, обусловлена АО-опосредованным сдерживанием мембранной деструкции.

Лимфоциты по сравнению с нейтрофилами менее чувствительны к действию агентов, индуцирующих образование липидных пероксидов [14]. В нашем опыте на сохранение относительной устойчивости лимфоцитов к окислительным медиаторам стресса может указывать стимуляция СДГ. Напротив, ранняя повреждающая реакция, связанная с возрастанием уровня первичных продуктов свободнорадикального окисления в плазме крови, сопровождается угнетением данного фермента [13], аналогичное торможение

СДГ отмечено и в случае резкого усиления стрессовой нагрузки на фоне предшествующего состояния резистентности [11, 18]. К тому же не исключена взаимосвязь обнаруженной нами активации дегидрогеназ с изменением характера иммунореактивности под влиянием стресса. Одновременное возрастание уровня СДГ и ЛДГ в лимфоцитах крови свойственно начальному этапу в реализации гуморального иммунного ответа [19]. Как проявление иммуностимулирующего эффекта рассматривалось и отмеченное при аналогичных экспериментальных условиях резкое увеличение числа плазматических клеток в селезенке [5].

Одна из вероятных причин иммуностимуляции при экстремальных воздействиях – индукция синтеза аутоантител, необходимая для нейтрализации продуктов обмена и ликвидации повреждений, обусловленных стрессом [20]. Повышенный уровень аутоантител определяется достаточно часто в ходе клинического обследования лиц, подвергавшихся длительному воздействию вибрационного фактора, при параллельном снижении показателей клеточного иммунитета, более чувствительного к супрессивным эффектам системы гипофиз-кора надпочечников [1]. В то же время разнонаправленное изменение в активности дегидрогеназ, которое наблюдалось у стрессированных крыс при вмешательстве АО (группа 3), по-видимому свидетельствует о переходе к экономизации окислительных процессов, отражая общую тенденцию, характерную для оптимизирующего действия адаптогенов, и связанную со снижением энергетических потребностей клетки.

Отсутствие нормализующего эффекта АО на уровни НЭ и ЛКБ указывает на необходимость выбора функционально неоднородных параметров клеточной реактивности в ходе изучения препаратов, повышающих устойчивость к вибрационному стрессу, хотя первичный анализ эффективности адаптогенов может быть достаточно показательным на основе ферментативной оценки состояния окислительно-восстановительного гомеостаза [2]. Ранее сообщалось о способности природных АО предохранять цитохимическую реакцию на эстеразу в лимфоцитах от снижения после однократного окислительного повреждения, когда протекторное действие лимитируется системами антипероксидной защиты [15]. Последние, однако, как показывают наши данные, не являются достаточно результативными при длительном стрессировании, то есть, в период усиления регуляторного влияния механизмов долгосрочной адаптации, существенно модифицирующих активность НЭ в лимфоцитах [21], что отмечается и у горнорабочих, продолжительно контактирующих с виброинструментами [22].

Снижение уровня ЛКБ может проявляться при стрессе, начиная с нейтрофилов костного мозга [23], а в ходе многократных воздействий – вне связи с реализацией секреторной функции [24]. В нашем случае данный метаболический сдвиг, сохранявшийся при введении комплекса АО, возможно, имел отношение к катаболическому эффекту, обусловленному глюкокортикоидами, ответственными и за активацию лизосомальных гидролаз, включая КФ [25]. Вместе с тем на особенности гормонального контроля использованные нами препараты, возможно, также оказывали влияние, которое, по-видимому, именно в силу своей избирательности практически оставляло без изменения уровни НЭ, ЛКБ и КФ, но было причастно к стимуляции фагоцитоза. Как известно, в результате стресс-индуцированного усиления секреции кортикостерона, входящего в число основных гормональных регуляторов адаптационного процесса, уровень поглотительной активности нейтрофилов крыс имеет склонность не только снижаться [4],

но и возрастать [26], что в нашем случае могло быть одним из условий, обеспечивающих повышенную индуцибельность фагоцитарной реакции при введении антиоксидантов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Таким образом, комплексный анализ метаболической активности лейкоцитов периферической крови, проведенный нами впервые в условиях предложенной ранее модели вибрационного стресса, показывает дифференцированные изменения на уровне периферического звена, зависящие от специфики морфофункциональной локализации. Это позволяет охарактеризовать состояние различных внутриклеточных механизмов, участвующих в реализации стресс-реакции, и в определенной степени даёт возможность оценить избирательность нормализующего влияния препаратов, оказывающих антиоксидантный (адаптогенный) эффект.

Авторы искренне признательны сотрудникам Ангарского НИИ медицины труда и экологии человека, особенно директору института, чл.-корр. РАМН, профессору В.С. Рукавишникову, за всестороннюю поддержку при проведении настоящего исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Кирьяков В.А., Павловская Н.А., Сухова А.В., Антошина Л.И.* (2005) Вестн. РАМН, № 3, 27-29.
2. *Оганесян К.Р.* (2002) Бюлл. exper. биол., **134**(8), 157-159.
3. *Долгушин М.В.* (2004) Бюлл. Вост.-Сиб. научн. центра СО РАМН, №4, 90-92.
4. *Gunasekaran R.* (2001) Ind. J. Physiol. Pharmacol., **45**(4), 487-492.
5. *Ефремов А.В., Боброва С.В., Вакулин Г.М.* (2002) Мед. иммунология, **4**(2), 327.
6. *Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Истамов Х.И.* (1995) Экологическая иммунология, ВНИРО, М.
7. *Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д.* (1983) Гематологическая цитохимия (пер. с англ.), Медицина, М.
8. *Меньшиков В.В. (ред.)* (1987) Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник, Медицина, М.
9. *Алиев В.А.* (1979) Нормы энзимоцитохимических показателей лейкоцитов крови как критерии оценки состояния здоровья. Баку.
10. *Горизонтов П.Д., Белоусова О.И., Федотова М.И.* (1983) Стресс и система крови, Медицина, М.
11. *Казакова Т.В.* (2009) Сибирский мед. журнал (Иркутск), № 3, 107-110.
12. *Власова М.Е., Березовская И.В., Гукасов В.М.* (1983) Хим.-фарм. журнал, **17**(12), 1432-1436.
13. *Власова М.Е., Березовская И.В., Петрова Л.И.* (1985) Лаб. дело, №12, 713-716.
14. *Bechoua S., Dubous M., Domingues Z., Goncalves A., Nemoz G., Lagarde M., Prigent A.F.* (1999) Biochem. Pharmacol., **57**(9), 1021-1030.
15. *Cetek M., Enginar H., Karaca T., Unak P.* (2006) Photochem. Photobiol., **82**(6), 1691-1696.
16. *Moszczyński P.* (1980) Folia Haematol., **107**(5), 747-756.
17. *Соколов В.В., Сомов Б.А., Иванова Л.А., Демичева Н.И., Горизонтова М.Н., Рендель Э.И.* (1987) Вестник дерматол. венерол., № 5, 19-24.

18. *Игнатьева С.Н., Кубасов Р.В.* (2009) Мед. труда и пром. экол., № 6, 23-27.
19. *Труфакин В.А., Трунова Л.А.* (1994) Вестн. РАМН, № 7, 15-18.
20. *Давтян Т.К., Аванесян Л.А.* (2001) Успехи соврем. биол., **121**(3), 275-286.
21. *Кадричева С.Г., Савченко А.А., Догадин С.А.* (2003) Проблемы эндокринолог., **49**(3), 14-18.
22. *Долгушин М.В., Лизарев А.В.* (2008) Известия Самарск. научн. центра РАН, Спец. выпуск: 13-й конгресс "Экология и здоровье человека". Т.2., 23-26.
23. *Мазинг Ю.А.* (1990) Вопр. мед. химии, **36**(6), 8-10.
24. *Лунина Н.В., Агафонова Н.А.* (1986) Физиол. журнал им. И.М. Сеченова, **72**(7), 952-958.
25. *Панин Л.Е., Маянская Н.Н.* (1987) Лизосомы: роль в адаптации и восстановлении. Наука, Новосибирск.
26. *Archana R., Namasivayam A.* (1999) Ind. J. Physiol. Pharmacol., **43**(1), 491-495.

Поступила: 10. 01. 2012.

INFLUENCE OF VIBRATION-INDUCED STRESS ON FUNCTIONAL-METABOLIC STATUS OF BLOOD LEUKOCYTES

M.V. Dolgushin¹, N.S. Davydova²

¹Research Institute of Biophysics, State Establishment of Higher Occupational Education – State Technical Academy of Federal Agency for Education, ul. Partisanskaya, 2, Irkutsk Region, Angarsk, 665830 Russia; PO Box 4380; tel.: (8-395-5) 95-70-68; tel./fax: (8-395-5) 95-70-62; e-mail: maxdolg2008@yandex.ru

²Institute of Occupational Health and Human Ecology – Branch of Establishment of the Russian Academy of Medical Sciences, East-Siberian Scientific Centre of Human Ecology, Siberian Division of the Russian Academy of Medical Sciences, Angarsk, Russia

The chronic stress in albino rats caused by exposure to the whole-body vibration induced the significant changes in the functional-metabolic status of the blood cells. It involved the phagocytosis level and the lysosomal cationic proteins in the neutrophils, oxidative and hydrolytic processes in the neutrophils and lymphocytes. All the determined intracellular parameters revealed the differentiated response to stress as well as to the additive combined administration of the antioxidants (glycine and α -tocopherol acetate).

Key words: leukocytes, metabolism, cytochemistry, phagocytosis, vibration-induced stress, antioxidants.