

УДК: 613.644:612.766.1:576.344

Долгушин Максим Валерьевич

кандидат биологических наук,
доцент кафедры анатомии и гистологии человека,
Красноярский государственный медицинский университет
им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого
maxdolg2008@yandex.ru

Балканов Леонид Александрович

студент,
Красноярский государственный медицинский университет
им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого
neolid98@gmail.com

Вязев Антон Анатольевич

студент,
Красноярский государственный медицинский университет
им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого
vazev.anton@mail.ru

Maxim V. Dolgushin

Associate Professor at the Department of Human Anatomy and Histology
Prof. V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University
maxdolg2008@yandex.ru

Leonid A. Balkanov

Student
Prof. V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University
neolid98@gmail.com

Anton A. Vazev

Student
Prof. V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University
vazev.anton@mail.ru

ГИСТОХИМИЯ КЛЕТОК КРОВИ В ОЦЕНКЕ РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМА НА ВОЗДЕЙСТВИЕ ЛОКАЛЬНОЙ ВИБРАЦИИ

HYSTOCHEMISTRY OF BLOOD CELLS IN ASSESSMENT OF BODY'S RESPONSE TO EXPOSURE TO LOCAL VIBRATION

Аннотация. Авторы статьи исследовали направленность изменения гистохимических показателей на щелочную фосфатазу и гликоген в лейкоцитах крови у больных с вибрационной патологией различной степени тяжести. Снижение уровня реакций на щелочную фосфатазу и гликоген в нейтрофилах имело закономерный характер при прогрессировании вибрационной патологии. Снижение содержания гликогена в лимфоцитах наблюдалось вне связи с тяжестью заболевания, но в определённой

зависимости от профессиональной специализации обследуемых. Возможно, что отмеченные особенности в изменении гистохимических реакций обусловлены влиянием различных механизмов долгосрочной адаптации к экстремальному воздействию.

Ключевые слова: вибрация, стресс, лейкоциты, щелочная фосфатаза, гликоген, гистохимия.

Annotation. *The change trend of the histochemical indices for alkaline phosphatase and glycogen in the peripheral blood leucocytes in the patients with the vibration-induced pathology of different severity has been studied. The decrease in the level of alkaline phosphatase and glycogen reactions in the neutrophils was found to have a regular character in progressing the vibration-induced disease. The decrease in the glycogen content was observed to be in the lymphocytes without the correlation to the disease severity degree, although in the defined dependence on the occupational specialization of the patients examined. It is possible that the features observed in the change in the glycogen content in the neutrophils and the lymphocytes may be stipulated by the effects of different mechanisms of the long-standing adaptation to the extreme exposure.*

Key words: vibration, stress, leucocytes, glycogen, alkaline phosphatase, histochemistry.

В последнее время наблюдается повышенный интерес к гематологическим лабораторным тестам в клинике вибрационной болезни (ВБ), что связано с перспективой рассмотрения метаболических изменений в системе крови в качестве дополнительных диагностических признаков ранних и выраженных проявлений патологии [1; 2; 3].

Реакция клеток крови на длительное воздействие вибрации обусловлена развитием целого комплекса нейрогормональных и нейрососудистых нарушений, имеющих свои особенности в зависимости от степени выраженности ВБ [1; 2]. При этом очевидно, что периферические и системные сдвиги, вызванные длительным контактом с виброинструментами, должны оказывать влияние на состояние внутриклеточного энергетического обмена, играющего активную роль в адаптационно-компенсаторных процессах.

Данное обстоятельство делает актуальным исследование особенностей энергообеспечения в клетках крови у рабочих с диагнозом ВБ, включая оценку уровня таких параметров, как гликоген и щелочная фосфатаза (ЩФ). Гликоген является легкодоступной резервной формы глюкозы (основного субстрата энергетического обмена). Щелочная фосфатаза также связана с энергетическим обменом, её продуктом и одновременно регулятором её активности является неорганический фосфат (Фн), уровень которого зависит от интенсивности гликолиза: ускорение гликолиза в нейтрофилах приводит к пониженному потреблению Фн, и как следствие – к активации ЩФ, тогда как замедление гликолиза приводит к ингибированию данного фермента [4]. Как известно, гистохимический анализ позволяет без особых затруднений обнаружить ЩФ и гликоген в лейкоцитах, что может быть использовано в ходе клинического

наблюдения за лицами, подверженными риску развития профессиональных заболеваний [5;6;7].

В связи с вышеизложенным нами была поставлена цель: выявить устойчивые тенденции в изменении активности ЩФ и содержания гликогена в нейтрофилах и лимфоцитах у больных ВБ, входящих в различные профессиональные группы. Выполнение механосборочных работ связано с изолированным воздействием вибрации, тогда как горнорабочим помимо контакта с виброинструментами присущи некоторые особенности в условиях труда (включая запылённость и охлаждающий микроклимат), которые способны модулировать метаболические эффекты шумовибрационного фактора [8]. Именно поэтому учёт специфических условий, связанных с профессией обследуемых, позволил бы более обоснованно подойти к заключению о клинико-диагностической значимости внутриклеточных сдвигов в активности ЩФ и содержании гликогена при ВБ.

Исследование проводилось на базе ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований» (г. Ангарск). Под наблюдением находились лица с диагнозом ВБ, индуцированной воздействием локальной вибрации (n=133), которые были отнесены к различным группам в зависимости от места работы. В число обследуемых входили слесари агрегатно-сборочных цехов одного из промышленных предприятий г. Иркутска (n=50), а также горнорабочие из Сахалинской области (n=46), Читинской области (n=21) и Красноярского края (n=16). Кроме того, все первые три вышеуказанные группы лиц были разделены на подгруппы в зависимости от выявленной у них при обследовании тяжести ВБ (I степень или II степень). В качестве контроля (n=18) были задействованы рабочие слесарного цеха, не подвергавшиеся воздействию профессиональных вредностей.

Параллельная группа сравнения включала рабочих агрегатно-сборочных цехов, подвергавшихся продолжительному влиянию локальной вибрации, но не заболевших ВБ (n=20). Взятие мазков крови для гистохимического определения гликогена у больных ВБ из г. Иркутска, а также у лиц, составлявших контрольную группу и группу сравнения, проводили в ходе медицинского осмотра. У всех остальных пациентов мазки крови были взяты при поступлении в клинику ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований» (г. Ангарск).

Активность ЩФ в нейтрофилах определяли реакцией азосочетания (инкубируя мазки крови в течение 15 минут), гликоген в лейкоцитах выявляли при помощи ШИК-реакции, предварительно фиксируя мазки в абсолютном этаноле и контролируя специфику реакции амилазой [9]. Ядра клеток после инкубации на ЩФ докрашивали в 0,1 %-ном растворе нейтрального красного в течение 5 минут, а после постановки ШИК-реакции – в течение 20 минут 2%-ным раствором метилового зелёного, предварительно очищенного хлороформом от примесей метилового фиолетового. Результаты определения уровня реакций в нейтрофилах выражали в условных единицах среднего цитохимического коэффициента (СЦК) по L. Karlow [9], а в лимфоцитах – в

процентах положительно реагирующих клеток. Статистическую оценку достоверности выявленных изменений в значениях цитохимических параметров проводили с использованием U-критерия (Манна-Уитни).

Статистически значимые изменения в активности ЩФ и в содержании гликогена были отмечены во всех группах лиц с диагнозом ВБ и по отношению к контролю имели одинаковую направленность – в сторону уменьшения (Таблица). При этом реактивные особенности лейкоцитов, связанные с тяжестью патологии и с профессиональной специализацией обследуемых, были обнаружены при сравнении метаболических сдвигов в различных типах клеток.

Снижение уровня ЩФ и гликогена в нейтрофилах проявлялась при прогрессировании ВБ (II степень), вне зависимости от профессии рабочих, контактирующих с виброинструментами.

Напротив, снижение содержания гликогена в лимфоцитах можно считать характерным для начальной стадии заболевания. В подгруппах лиц с диагнозом II степени ВБ уменьшение числа гликогенположительных лимфоцитов в периферической крови было типичным только для горнорабочих, отсутствуя у рабочих агрегатно-сборочных цехов, составляющих группу 3. Кроме того, влияние профессиональной специализации больных ВБ на число лимфоцитов, содержащих гликоген, выражалась в более высоком уровне статистической достоверности изменений этого параметра по отношению к контролю в подгруппах горнорабочих. В том случае, когда длительное воздействие вибрации не приводило к развитию ВБ (группа 2), содержание гликогена снижалось в лимфоцитах, но не в нейтрофилах. В связи с этим сдвиги данного показателя в лимфоцитах относительно группы 2 были выражены крайне слабо (проявляясь лишь у горнорабочих из группы 5 с диагнозом I степени ВБ), а в нейтрофилах по уровню статистической значимости были сходными с изменениями по отношению к контролю.

Таблица

Изменение активности щелочной фосфатазы и содержания гликогена в лейкоцитах периферической крови у рабочих виброопасных профессий

Группа	Сте- пень ВБ	Щелочная фосфатаза в нейтрофилах (СЦК)	Гликоген в нейтрофилах (СЦК)	Гликоген в лимфоцитах (%)
1. Контроль	-----	0,52 ± 0,03	1,90 ± 0,01	21,8 ± 2,2
2. Слесари-сборщики без диагноза ВБ	-----	0,59 ± 0,04	1,90 ± 0,01	14,1 ± 1,2*
3. Слесари-сборщики (г. Иркутск)	I ст. II ст.	0,50 ± 0,04 0,38 ± 0,01**##\$	1,88 ± 0,01 1,83 ± 0,01**##\$	15,1 ± 1,5* 18,4 ± 1,3
4. Горнорабочие	I ст.	0,43 ± 0,09	1,89 ± 0,02	8,4 ± 1,0**#

(Сахалинская обл.)	II ст.	0,39 ± 0,02**##	1,82 ± 0,01**##\$	11,4 ± 1,1**
5. Горнорабочие (Читинская обл.)	II ст.	0,35 ± 0,03**##	1,83 ± 0,02**##	10,1 ± 1,1**
6. Горнорабочие (Красноярский край)	II ст.	0,38 ± 0,02**##	1,83 ± 0,01**##	11,2 ± 1,4**

Примечание. Показана достоверность отличия цитохимических показателей у больных ВБ различной степени тяжести по отношению к контролю (* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$), по отношению к группе 2 (работающие с виброинструментами, но без диагноза ВБ, # - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$) и к подгруппе обследуемых с I степенью ВБ (\$ - $p < 0,05$).

Обнаруженное нами закономерное снижение активности ЩФ и содержания гликогена в нейтрофилах может быть обусловлено стабильно выявляемой при выраженных формах ВБ экономизацией функций щитовидной железы [1]. На уровне периферической крови это проявляется уменьшением концентрации тиреоидных гормонов, способных, как известно, оказывать заметный стимулирующий эффект на метаболические процессы в нейтрофильных гранулоцитах [10; 11]. Вместе с тем, некоторое ослабление (экономизация) функциональной активности щитовидной железы является одним из признаков, сопровождающих переход к стадии резистентности в ходе адаптации организма к хроническим стрессовым нагрузкам [12].

В отличие от реакции нейтрофилов, изменение уровня гликогена в лимфоцитах было закономерным уже для начальных симптомов ВБ, и, по всей видимости, обусловлено повышенным его расходом на более ранних этапах стресс-реакции, связанных с усилением эрготропных (симпатических) влияний. В таком случае есть основание предполагать, что отмена повышенного распада гликогена, выявленная нами в одной из групп обследуемых при прогрессировании ВБ и отмечавшаяся ранее в ходе предыдущего медицинского осмотра на том же предприятии [8], вероятно, является проявлением трофотропного (парасимпатического) эффекта. Как известно, данный регуляторный сдвиг сопровождается повышением уровня гликогена в лимфоцитах [7]. В свою очередь, преобладание трофотропного влияния над эрготропным рассматривается в качестве одного из механизмов в динамике долгосрочной адаптации к экстремальным воздействиям [13; 14].

При этом необходимо отметить, что в группе 2 (включающей работающих с виброинструментами без диагноза ВБ) в ходе адаптационного процесса у лиц, контактирующих с виброинструментами 10 и более лет, также могла происходить реализация подобного механизма, препятствующего снижению внутриклеточного содержания гликогена в лимфоцитах. Процент лимфоцитов, реагирующих на гликоген, в данной подгруппе ($n=11$) составлял в среднем $16,3 \pm 1,6$ (не отличаясь достоверно от контроля), статистически достоверное снижение по отношению к контролю процентного числа клеток с положительной реакцией наблюдалось лишь в подгруппе с меньшим стажем работы ($n=9$), составляя в среднем $11,7 \pm 1,2$ ($p < 0,01$).

Кроме того, мы посчитали целесообразным сравнить уровень гликогена положительных лимфоцитов в вышеуказанной подгруппе здоровых лиц, проработавших с виброинструментами 10 и более лет ($16,3 \pm 1,6 \%$; $n=11$), и у лиц с диагнозом ВБ, поскольку практически у всех обследованных нами больных продолжительность контакта с вибрацией была аналогичной, превышая 9 лет. При таком сравнении также достаточно отчетливо проявлялось влияние профессиональной специфики на изменение в состоянии энергетического обмена лимфоцитов при ВБ: по отношению к подгруппе здоровых лиц со стажем работы более 9 лет достоверное снижение числа лимфоцитов, положительных на гликоген, наблюдалось лишь у горнорабочих, вне зависимости от тяжести клинической симптоматики.

Возможно, что, свойственный лимфоцитам горнорабочих более выраженный метаболический ответ, направленный на уменьшение внутриклеточного уровня гликогена (и совершенно не затронутый тенденцией к нормализации при прогрессировании ВБ) обусловлен существенно большей интенсивностью стрессовой нагрузки у данной профессиональной категории обследуемых по сравнению с рабочими агрегатно-сборочных цехов, подвергавшихся изолированному воздействию шумовибрационного фактора. Подобная особенность реагирования гликогена в лимфоцитах может иметь значение в оценке неспецифических эффектов, индуцированных производственной вибрацией, а также неблагоприятными природно-климатическими условиями, способными, как было показано ранее, усиливать патогенное действие вибрационного фактора на организм горнорабочих [15].

Таким образом, для лейкоцитов периферической крови рабочих с диагнозом ВБ, индуцированной воздействием локальной вибрации, характерно снижение активности ЩФ и содержания гликогена. Данная метаболическая реакция, отражающая сдвиги в состоянии энергетического обмена, проявляется различным образом в лимфоцитах и нейтрофилах. Пониженный уровень гликогена в лимфоцитах отмечается вне зависимости от тяжести ВБ (у горнорабочих в несколько большей степени, чем у лиц, выполняющих механосборочные работы), тогда как снижение уровня гликогена и ЩФ в нейтрофилах проявляется при прогрессировании патологии и вне связи с особенностями профессиональной деятельности обследуемых. Влияние клеточной специфики на реакцию гликогена может иметь отношение к различным механизмам реализации адаптационного процесса при умеренных и умеренно-выраженных симптомах ВБ, наблюдающихся соответственно при первой и второй стадиях заболевания. Полученные данные предполагают возможность использования цитохимических параметров крови с диагностическими целями, а также в оценке тяжести стрессовой нагрузки при длительном воздействии вибрационного фактора.

Авторы выражают признательность сотрудникам ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований» (г. Ангарск) за организационную и техническую помощь и поддержку при проведении настоящего исследования.

Литература:

1. Кирьяков В.А., Павловская Н.А., Сухова А.В., Антошина Л.И. Современные лабораторные маркеры ранних стадий формирования вибрационной патологии // *Вестник Рос. АМН.* – 2005. – № 3. – С. 27-29.
2. Лапко И.В., Кирьяков В.А., Павловская Н.А. и др. Выбор информативных лабораторных биомаркеров для раннего выявления изменений нейрогуморальной регуляции и углеводного обмена у рабочих горнодобывающей промышленности и машиностроения // *Гигиена и санитария.* – 2016. – Т. 95, № 11 – С. 1061-1065.
3. Kao D.S., Yan J.G., Zhang L.L. et al. Serological tests for diagnosis and staging of hand-arm vibration syndrome // *Hand.* – 2008. – Vol. 3, № 2. – P. 129-134.
4. Шубич М.Г., Нагоев Б.С. Щелочная фосфатаза лейкоцитов в норме и патологии. – М.: Медицина, 1980 – 224 с.
5. Мясягутова Л.М., Бакиров А.Б., Бадаמיнова Г.Г., Гимранова Г.Г. Особенности внутриклеточного метаболизма у работников сельского хозяйства // *Мед. труда и пром. экол.* – 2013. – № 3. – С. 27-31.
6. Долгушин М.В., Потрохов О.И. Цитохимия лимфоцитов периферической крови в оценке тяжести острой интоксикации продуктами горения // *Клин. лаб. диагност.* – 2010. – № 10. – С. 17-17а.
7. Татарина О.М. Цитохимические исследования лейкоцитов периферической крови у лиц, работающих с нитроглицеринами // *Токсикология, гигиена, профпатология при работе с опасными химическими веществами. Информ. сборник № 1.* – СПб., 2007. – С. 88-92.
8. Долгушин М.В. Метаболический статус лимфоцитов периферической крови у рабочих виброопасных профессий // *Бюл. Вост.-Сиб. научн. центра СО РАМН.* – 2004. – № 4. – С. 27-29.
9. Клиническая цитохимия / Под ред. А.В. Ягоды, Н.А. Локтева. – Ставрополь: Изд-во СтГМА, 2005. – 485 с.
10. Бабич Н.О., Антоняк Г.Л., Тымочко М.Ф. Влияние тироксина на активность некоторых ферментов энергетического обмена в миелоидных клетках костного мозга и нейтрофилах крови поросят // *Вопр. мед. химии.* 2000. – Т. 46, № 2. – С. 162-168.
11. Fernandez V., Videla A. On the mechanism of thyroid hormone-induced respiratory burst activity in rat polymorphonuclear leukocytes // *Free Radic. Biol. Med.* - 1995. – Vol. 19, № 3. – P. 359-363.
12. Тигранян Р.А. Гормонально-метаболический статус организма при экстремальных воздействиях. – М.: Наука, 1990. – 288 с.
13. Farrace S., Ferrara M., De Angelis C. et al. Reduced sympathetic outflow and adrenal secretory activity during a 40-day stay in the Antarctic // *Int. J. Psychophysiol.* – 2003. – Vol. 49, № 1. – P. 17-27.
14. Horowitz M., Meiri U. Central and peripheral contributions to control of heart rate during heat acclimation // *Pflugers Arch.* – 1993. – Vol. 422, № 4. – P. 386-392.

15. Колесов В.Г. Роль природно-климатических факторов в развитии вибрационной патологии и рефлекторных синдромов шейного остеохондроза у горнорабочих // Региональные экологические проблемы и здоровье населения. – Ангарск, 1999. – С. 93-98.

Literature:

1. Kir'yakov V.A., Pavlovskaya N.A., Sukhova A.V., Antoshina L.I. Current laboratory markers of the development of early stage vibration pathology // Vestn. Ros. Akad. Med. Nauk. – 2005. – № 3. – P. 27-29.

2. Lapko I.V., Kir'yakov V.A., Pavlovskaya N.A et al. Choice of informative laboratory biomarkers for the early identification of changes in neurohumoral regulation and carbohydrate exchange in workers of the mining and mechanical engineering industry // Gig. i Sanit. – 2016. – Vol. 95, № 11. – P. 1061-1065.

3. Kao D.S., Yan J.G., Zhang L.L. et al. Serological tests for diagnosis and staging of hand-arm vibration syndrome // Hand. – 2008. – Vol. 3, № 2. - P. 129-134.

4. Shubich M.G., Nagoev B.S. Alkaline phosphatase of leukocytes in health and disease. – Moscow: Meditsina, 1980. – 224 p.

5. Masyagutova L.M., Bakirov A.V., Badamshina G.G., Gimranova G.G. Specificities of intracellular metabolism in agricultural workers // Med. Truda Prom. Ekol. – 2013. – № 3. – P. 27-31

6. Dolgushin M.V., Potrokhov O.I. Cytochemistry of peripheral blood lymphocytes in evaluation of acute intoxication severity // Klin. Lab. Diagnost. – 2010. - № 10. – P. 17-17a.

7. Tatarinova O.M. Cytochemical examination of peripheral blood lymphocytes in workers Exposed to nitroglycols // Toxicology, hygiene, and occupational pathology during handling of hazardous chemical substances: Collection of papers № 1. – St. Petersburg, 2007. – P. 88-92.

8. Dolgushin M.V. Metabolic status of peripheral blood lymphocytes in workers engaged in dangerous vibration exposed jobs // Byull. Vost. Sib. Nauchn. Tsentra SO RAMN. – 2004 - № 4. – P. 27-29.

9. Clinical cytochemistry / Edited by A.V. Yagoda and N.A. Loktev – Stavropol, 2005. – 485 p.

10. Babich N.O., Antoniak G.L., Tymochko M.F. Effect of thyroxine on the activity of some enzymes of energy metabolism in bone marrow myeloid cells and blood neutrophils from piglets // Vopr. Med. Khim. – 2000. – Vol. 46, № 2. – P. 162-167.

11. Fernandez V., Videla A. On the mechanism of thyroid hormone-induced respiratory burst activity in rat polymorphonuclear leukocytes // Free Radic. Biol. Med. - 1995. – Vol. 19, № 3. – P. 359-363.

12. Tigranyan R.A. Hormonal and metabolic status of the human body under extreme conditions. – Moscow: Nauka, 1990. – 288 p.

13. Farrace S., Ferrara M., De Angelis C. et al. Reduced sympathetic outflow and adrenal secretory activity during a 40-day stay in the Antarctic // Int. J. Psychophysiol. – 2003. – Vol. 49, № 1. - P. 17-27.

14. Horowitz M., Meiri U. *Central and peripheral contributions to control of heart rate during heat acclimation // Pflugers Arch. – 1993. – Vol. 422, № 4. – P. 386-392.*

15. Kolessov V.G. *The role of natural and climatic factors in the development of vibration pathology and reflectory syndromes of cervical osteochondrosis in miners // Regional ecological problems and population health. – Angarsk, 1999. – P. 93-98.*