

ГІГІЄНА І ПРОФЕСІЙНА ПАТОЛОГІЯ

УДК 616.233/.24-003.6-057-099:612.015.11

В.А. Капустник, О.Г. Мельник

Харківський національний медичний університет

ІНТЕНСИВНІСТЬ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ЕНДОГЕННІ ІНТОКСИКАЦІЇ У ХВОРИХ НА ПРОФЕСІЙНІ ПИЛОВІ ЗАХВОРЮВАННЯ БРОНХОЛЕГЕНЕВОЇ СИСТЕМИ

У робітників ливарного виробництва, хворих на пневмоконіоз і хронічний пиловий бронхіт, виявлено підвищення вільнорадикального окиснення білків, рівня ендогенної інтоксикації та порушення структурно-функціональних властивостей клітинних мембран. Це підтверджується збільшенням у крові карбонільних груп, середньомолекулярних пептидів, інтенсивності фосфоресценції на тлі зниження електронегативності ядер букального епітелію. У пацієнтів з пиловим бронхітом на відміну від пацієнтів з пневмоконіозом спостерігається збільшення вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів – дієнів і ТБК-активних продуктів, інтенсивності біохемілюмінесценції сироватки крові.

Ключові слова: *пневмоконіоз, хронічний пиловий бронхіт, вільнорадикальні процеси, ендогенна інтоксикація.*

Серед показників, що характеризують здоров'я населення, професійна захворюваність має найбільше значення, оскільки її виникнення етіологічно пов'язане зі шкідливими виробничими чинниками. Профзахворюваність в Україні збільшується у кількісному відношенні та погіршується за вираженістю нозологічних форм, зокрема пилових захворювань бронхолегеневої системи у робітників ливарного виробництва машинобудування [1]. Останнє належить до тих галузей промисловості, технологічні процеси яких пов'язані з інтенсивним впливом на організм працюючих комплексу виробничих факторів, у першу чергу пилу та хімічних речовин фіброгенної дії [2]. Провідне місце в структурі професійної захворюваності робітників належить хворобам органів дихання пилової етіології – пневмоконіозу (ПКЗ) і хронічному пиловому бронхіту (ХПБ). Останні мають тривалий латентний період, хро-

нічний прогресуючий перебіг, призводять до стійкого порушення працездатності, ранньої інвалідизації, погіршення якості життя, що завдає суттєвої економічної шкоди. Крім того, ПКЗ і ХПБ характеризуються слабо вираженими клінічними проявами. При цьому ранні метаболічні зміни крові за умов впливу промислового пилу не діагностуються як патологічні. Біохімічні тести, що використовуються при проведенні медичних оглядів, дозволяють лише підтвердити наявність органічних змін, викликаних вдиханням пилу та визначають, як правило, вже розгорнуту клінічну картину пилової патології. Тому на даний час не втрачають своєї значущості дослідження з вивчення патохімічних механізмів пошкодження легеневої тканини, пошуку можливостей для ранньої діагностики та нових підходів до лікування пилових захворювань бронхолегеневої системи.

© В.А. Капустник, О.Г. Мельник, 2012

Метою даного дослідження була оцінка інтенсивності вільнорадикальних процесів та ендогенної інтоксикації у робітників ливарного виробництва машинобудування, хворих на ПКЗ і ХПБ.

Матеріал і методи. Дослідження проводили на 67 хворих з підтвердженим діагнозом ПКЗ та 25 хворих з діагнозом ХПБ, які проходили обстеження й лікування в клініці НДІ гігієни праці та професійних захворювань ХНМУ. Всі хворі – робітники ливарного виробництва машинобудівних заводів України. Контрольну групу становили 80 практично здорових осіб, які не мали контакту з промисловими факторами виробництва, достовірно не відрізнялися від пацієнтів за статтю та віком. Для досягнення поставленої мети використовували біохемілюмінесцентний (БХЛ) метод, флуоресцентний (ФС) аналіз, визначали відсоток електронегативності ядер нативних клітин букального епітелію та вміст дієнових кон'югат (ДК), ТБК-активних продуктів, карбонільних груп окисно-модифікованих білків (КГОМБ), середньомолекулярних пептидів (СМП). Реєстрацію інтенсивності БХЛ сироватки крові проводили на медичному хемілюмінометрі ХЛМ Ц1-01 відповідно до загальноприйнятих методик [3], люмінол-індукованої ФС – спектрофлуориметричним методом при кімнатній температурі в режимі підрахунку фотонів лічильником СБС-2. Рівень КГОМБ плазми крові визначали за методом [4], що базується на реакції взаємодії окислених амінокислотних залишків з 2,4-динітрофенілгідразином з утворенням динітрофенілгідразонів, оптичну щільність яких реєстрували на спектрофотометрі СФ-46 при 363 нм. Вміст ДК у сироватці крові визначали спектрофотометричним методом за допомогою коефіцієнта молярної екстинкції, що становить $2,2 \cdot 10^5 \text{ M} \cdot \text{cm}^{-1}$ [5]. Вміст ТБК-активних продуктів оцінювали за методом [6], що базується на реакції між малоновим діальдегідом і тіобарбітуровою кислотою, в якій за умов високої температури та кислого середовища утворюється забарвлений триметиновий комплекс з максимумом поглинання при 532 нм. Вміст СМП у плазмі крові визначали за спектрофотометричним методом [7]. Для визначення відсотка електронегативності ядер клітин букального епітелію зскрібок зі слизових оболонок

наносили тонким шаром на предметне скло, в якому на відстані 20 мм закріплені металеві електроди. Електрокінетичну рухливість визначали при силі струму 0,1 мА та напрузі 25–30 В протягом 3–5 хв. Для оцінки зсувів клітинних ядер використовували мікроскоп МБІ-3 при збільшенні 400, величину електронегативності виражали у відсотках до 100 спостережуваних клітин у кожному препараті. Статистичний аналіз даних проводили з використанням комп'ютерного пакета прикладних програм для обробки статистичної інформації Statistica 6.1 (StatSoft, Inc., США). Первинне статистичне опрацювання кількісних експериментальних даних починали з перевірки припущення про відповідність розподілу отриманих вибірок закону нормального розподілу. Кількісні ознаки, що мали нормальний розподіл, описували параметричними характеристиками – середнім значенням досліджуваного показника (M) та середньоквадратичним відхиленням (s); у разі відсутності нормального розподілу непараметричними характеристиками – медіаною вибірки (Me) та інтерквартильним розмахом. Для порівняння двох нормальних розподілів застосовували t-критерій Стьюдента. Якщо принаймні один із розподілів не був нормальним, то для порівняння незалежних вибірок застосовували критерій Манна–Уїтні. За критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймали $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. У пацієнтів із ПКЗ не виявлено будь-яких статистично значущих змін ($p > 0,05$) вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів у сироватці крові порівняно з контролем, тоді як у хворих на ХПБ спостерігалось достовірно значуще ($p < 0,001$) збільшення вмісту ДК і ТБК-активних продуктів відповідно на 81 і 107 %. При зіставленні рівнів цих показників у хворих ХПБ і ПКЗ також виявлено статистично значущі відмінності ($p < 0,001$), табл. 1.

Слід підкреслити, що при ПКЗ виявлено, порівняно з контролем, зниження ($p = 0,003$) інтенсивності БХЛ сироватки крові на 22 %, а при ХПБ, навпаки, її підвищення на 77 %. Зниження інтенсивності БХЛ при ПКЗ свідчить про недостатність утворення активних форм кисню (АФК) та вільних радикалів фагоцитуючими клітинами, що може спровокувати хронізацію захворювання. Крім того,

Таблиця 1. Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів і білків, інтенсивність люмінолзалежної біохемілюмінесценції крові хворих на пневмоконіоз і хронічний пиловий бронхіт (Me [25 %; 75 %] або $M \pm s$)

Показник	Контроль	Хворі на пневмоконіоз	Хворі на хронічний пиловий бронхіт
Дієнові кон'югати, ммоль/л	18,65 [16,58; 20,49]	22,58 [18,63; 25,06] $p=0,006$	33,67 [29,17; 34,16] $p, p_1 < 0,001$
ТБК-активні продукти, мкмоль/л	4,90 \pm 0,67	5,3 [4,72; 5,90] $p=0,056$	10,13 [9,16; 11,4] $p, p_1 < 0,001$
Інтенсивність біохемілюмінесценції, імп/с	748,3 [650,8; 839,6]	587,0 [543,0; 618,1] $p=0,003$	1321,0 [1284,2; 1358,0] $p, p_1 < 0,001$
КГОМБ, мкмоль/мг	1,91 [1,52; 2,17]	2,62 [2,33; 3,01] $p < 0,001$	4,18 [3,48; 4,62] $p, p_1 < 0,001$

Примітка. Різниця достовірна при порівнянні з показником: p – контролю, p_1 – хворих на пневмоконіоз.

доведено, що АФК відіграють активну роль на початкових етапах внутрішньоклітинної сигналізації, яка є багатокомпонентною системою передавання сигналу в клітинне ядро, й отримала назву редокс-сигналізації за початковим ланцюгом, чутливим до зміни рівня вільнорадикального окиснення [8]. Тому одним з наслідків інгібування редокс-сигналізації та опосередкованого передавання сигналу є дезактивація ядерних факторів транскрипції, які беруть безпосередню участь в активації генів, що кодують різні захисні системи. Наслідком такого ланцюга подій є зниження резистентності організму при адаптації до дії негативних факторів. Підвищення інтенсивності БХЛ при ХПБ, навпаки, свідчить, по-перше, про розгортання процесів вільнорадикального окиснення та їх пошкоджуючий вплив на тканини, а по-друге, про ініціацію редокс-сигналізації з подальшим підвищенням резервів в адаптаційній системі.

У хворих на ПКЗ простежувалося збільшення ($p < 0,001$) рівня КГОМБ плазми крові лише на 37 % порівняно з контролем, а у пацієнтів з ХПБ – в середньому на 119 % (табл. 1). Ці результати свідчать про активацію вільнорадикальної ОМБ, яка супроводжується змінами їх структури та функцій. Перспективним методичним підходом до ранньої діагностики функціональної активності білків сироватки крові є вимірювання інтенсивності ФС. Відомо, що природними

хромофорами білків є тирозинові та триптофанові залишки амінокислот, які оголюються за умов втрати компактною структурою білкової молекули. У обстежених хворих найбільш суттєві зміни інтенсивності ФС визначалися при 297, 404 і 434 нм. Так, порівняно з контролем, при ПКЗ інтенсивність ФС зростала ($p < 0,001$) відповідно на 75, 242 і 188 %, а при ХПБ – на 87, 258 і 208 %. При цих довжинах хвиль спостерігалися достовірно значущі різниці ($p < 0,001$) між показниками у хворих на ХПБ і ПКЗ (табл. 2).

Активация процесів ОМБ призводить до перебудови клітинних мембран, зміни метаболічних реакцій, виникнення ендогенної інтоксикації. Універсальними маркерами останньої є СМП – продукти порушеного метаболізму білків. СМП здатні чинити пряму мембранотоксичну дію, підвищення їх рівня в крові обумовлено порушенням їх елімінації з організму, посиленням утворення в тканинах або сполученням обох механізмів [9]. У сироватці крові хворих на ПКЗ і ХПБ визначалося збільшення ($p < 0,002$) рівня СМП, порівняно з контролем, відповідно на 111 і 121 %. При зіставленні значень цього показника у хворих обох груп між собою також виявлено достовірно значущу відмінність ($p = 0,004$), табл. 3.

Високоінформативним діагностично-прогностичним методом дослідження взаємодії промислових факторів і клітин живої тканини

Таблиця 2. Інтенсивність фосфоресценції сироватки крові хворих на пневмоконіоз і хронічний пиловий бронхіт, (Me [25 %; 75 %]) імн/с

Довжина хвилі збудження, нм	Контроль	Хворі на пневмоконіоз	Хворі на хронічний пиловий бронхіт
297	3265 [3112; 3429]	5710 [5441; 5912]*	6120 [5923; 6447]* **
404	510 [482; 531]	1742 [1676; 1826]*	1828 [1748; 1895]* **
434	589 [571; 619]	1697 [1621; 1770]*	1816 [1709; 1911]* **

Примітка: $p < 0,001$, різниця достовірна при порівнянні з показником: * контролю, ** хворих на пневмоконіоз.

Таблиця 3. Вміст середньомолекулярних пептидів у плазмі крові та відсоток електронегативності ядер у пробі нативних клітин букального епітелію хворих на пневмоконіоз і хронічний пиловий бронхіт (Me [25 %; 75 %])

Показник	Контроль	Хворі на пневмоконіоз	Хворі на хронічний пиловий бронхіт
СМП, у. о.	0,91 [0,81; 1,04]	1,92 [1,69; 2,05] $p < 0,002$	2,01 [1,92; 2,26] $p < 0,001$, $p_1 = 0,004$
Електронегативність ядер, %	42,2 [38,6; 46,3]	30,4 [26,5; 34,3] $p < 0,001$	29,2 [23,1; 32,9] $p = 0,0015$, $p_1 = 0,168$

Примітка. Різниця достовірна при порівнянні з показником: p – контролю, p_1 – хворих на пневмоконіоз.

є визначення відсотка електронегативності ядер у пробі нативних клітин букального епітелію [10]. У хворих на ХПБ і ПКЗ спостерігалось зниження ($p < 0,0015$) електронегативності ядер, порівняно з контролем, відповідно на 31 і 28 %. Порівняння цього показника в обох групах хворих не виявило будь-яких достовірно значущих відмінностей ($p = 0,168$), табл. 3. Виявлене функціональне порушення клітин букального епітелію свідчить про мембранну патологію у хворих за умов тривалого впливу факторів виробничого середовища, яка й призвела до змін ядерного потенціалу.

Висновки

1. Пневмоконіоз і хронічний пиловий бронхіт характеризуються підвищенням вільнорадикальної модифікації білків крові з порушенням їх компактно високоорганізованої структури та біологічної активності, що підтверджується збільшенням рівня карбонільних груп окисно-модифікованих білків і суттєвим підвищенням інтенсивності фосфоресценції сироватки крові. Враховуючи велику та різнобічну функціональну активність білків у тканинах, їх окисна модифікація при

досліджуваних патологічних станах носить на відміну від пероксидації ліпідів більш вибірко-вий та специфічний характер.

2. Хронічний пиловий бронхіт на відміну від пневмоконіозу характеризується збільшенням продуктів перекисного окиснення ліпідів – дієнових кон'югат і малонового діальдегіду, інтенсивності біохемілюмінесценції сироватки крові.

3. Досліджувані професійні захворювання бронхолегеневої системи пилової етіології супроводжуються суттєвим збільшенням сироватки крові вмісту середньомолекулярних пептидів – універсальних маркерів ендогенної інтоксикації та зниженням електронегативності ядер букального епітелію – маркера порушень структурно-функціональних властивостей клітинних мембран.

4. Визначення інтенсивності біохемілюмінесценції та фосфоресценції сироватки крові, відсотку електронегативності ядер у пробі нативних клітин букального епітелію може бути рекомендованим як прогностичний критерій для оцінки стану здоров'я робітників ливарного виробництва машинобудування.

Список літератури

1. Кундієв Ю. І. Професійне здоров'я в Україні і його роль у збереженні трудового потенціалу / Ю. І. Кундієв, А. М. Нагорна, В. І. Чернюк // Укр. журн. з проблем медицини праці. — 2007. — № 4 (12). — С. 10–17.
2. Перцев Д. П. Качество внутрипроизводственной среды рабочих основных профессий литейного производства / Д. П. Перцев // Гігієна населених місць. — 2005. — Вып. 46. — С. 484–489.
3. Красовский Г. Н. Применение метода биохемилюминесценции в санитарно-токсикологических исследованиях / Г. Н. Красовский, В. И. Жуков, Л. А. Бондаренко // Гигиена и санитария. — 1989. — № 9. — С. 35–39.
4. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е. Е. Дубинина, С. О. Бурмистров, Д. А. Ходов [и др.] // Вопросы медицинской химии. — 1995. — Т. 41, № 1. — С. 24–26.
5. Каухин А. Б. Экстракция липидов смесью гептан-изопропанол для определения диеновых конъюгатов / А. Б. Каухин, Б. С. Ахметова // Лаб. дело. — 1987. — № 6. — С. 335–337.
6. Федорова Т. Н. Реакции с тиобарбитуровой кислотой для определения малонового диальдегида крови методом флюориметрии / Т. Н. Федорова, Т. С. Коршунова, Э. Г. Ларский // Лаб. дело. — 1983. — № 3. — С. 25–28.
7. Габриэлян Н. И. Определение средних молекул скрининг-методом / Н. И. Габриэлян, А. А. Дмитриев // Клиническая медицина. — 1981. — № 10. — С. 38–42.
8. Сазонтова Т. Г. Роль свободнорадикальных процессов и редокс-сигнализации в адаптации организма к изменению уровня кислорода / Т. Г. Сазонтова, Ю. В. Архипенко // Рос. физиологич. журн. им. И. М. Сеченова. — 2005. — Т. 91, № 6. — С. 636–655.
9. Карякина Е. В. Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболических нарушений (обзор литературы) / Е. В. Карякина, С. В. Белова // Клини. лаб. диагностика. — 2004. — № 3. — С. 3–8.
10. Колупаева Т. В. Изменение электрического потенциала клеточного ядра в онтогенезе человека / Т. В. Колупаева, В. Г. Шахбазов // Биохимия и физиология возрастного развития организма. — 1992. — С. 282–285.

В.А. Капустник, О.Г. Мельник

ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ И ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ У БОЛЬНЫХ ПРОФЕССИОНАЛЬНЫМИ ПЫЛЕВЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ БРОНХОЛЕГОЧНОЙ СИСТЕМЫ

У рабочих литейного производства, больных пневмокониозом и хроническим пылевым бронхитом, выявлено повышение свободнорадикального окисления белков, уровня эндогенной интоксикации и нарушение структурно-функциональных свойств клеточных мембран. Это подтверждается увеличением в крови содержания карбонильных групп, среднемолекулярных пептидов, интенсивности флуоресценции на фоне снижения электроотрицательности ядер букального эпителия. У пациентов с пылевым бронхитом, в отличие от пациентов с пневмокониозом, наблюдается повышение продуктов перекисного окисления липидов – диенов и ТБК-активных продуктов, интенсивности биохемилюминесценции сыворотки крови.

Ключевые слова: пневмокониоз, хронический пылевой бронхит, свободнорадикальные процессы, эндогенная интоксикация.

В.А. Капустник, О.Г. Мельник

INTENSIVITY OF FREE-RADICAL PROCESSES AND ENDOGENOUS INTOXICATION IN PATIENTS WITH OCCUPATIONAL DUST DISEASES OF BRONCHOPULMONARY SYSTEM

Increase of proteins free-radical oxidation, endogenous intoxication level, disturbance of cell membrane structural and functional properties were revealed in foundry workers with pneumoconiosis and chronic dust bronchitis. This was proved by elevation of carbonyl groups, middle-molecular peptides, intensity of fluorescence on the background of decrease of electric negativity of buccal epithelium nuclei. In patients with dust bronchitis, as opposed to patients with pneumoconiosis, elevation of lipids peroxidation products – dienes and TBA-active products, intensity of biochemiluminescence of blood serum.

Key words: pneumoconiosis, chronic dust bronchitis, free-radical processes, endogenous intoxication.

Поступила 06.07.12