

Читать
онлайн
Read
online

Барскова Л.С., Виткина Т.И., Веремчук Л.В., Гвозденко Т.А.

Оценка влияния состава микрочастиц атмосферного воздуха на окислительно-восстановительный гомеостаз альвеолярных макрофагов

Владивостокский филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» – Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения, 690105, Владивосток, Россия

Введение. Компоненты и размерность твёрдых взвешенных частиц (ТВЧ) атмосферного воздуха различаются для территорий и зависят от источников генерации.

Цель работы – оценить связь качественного и дисперсного состава ТВЧ атмосферного воздуха с окислительными и антиоксидантными процессами в альвеолярных макрофагах.

Материалы и методы. Смоделировано воздействие реального поликомпонентного загрязнения приземного слоя атмосферного воздуха двух различных по техногенному прессингу территорий на альвеолярные макрофаги (АМ) крыс линии Вистар. Корреляционные связи между характеристиками АМ и загрязнения рассчитаны с помощью коэффициента корреляции Спирмена.

Результаты. Выделен превалирующий вклад качественных характеристик ТВЧ, при увеличении доли мелкодисперсных частиц усиливается влияние дисперсного состава. Частицы металлов вызвали окислительное повреждение липидов с образованием необратимых продуктов, со стороны антиоксидантной системы (АОС) наблюдалась выраженная компенсаторная ответная реакция. Минеральные компоненты оказывали необратимые окислительные повреждения липидных и белковых структур, вызывая интенсификацию образования тиоредоксина. Наибольшее патогенное воздействие, выявленное для частиц сажи, характеризовалось окислительным повреждением липидов, белков, нуклеиновых кислот. Напряжение функционирования АОС сопровождалось увеличением образования окисленного глутатиона и тиоредоксина, осуществляющего восстановление белков и ДНК.

Ограничения исследования. Ограничением является то, что исследование выявило ответную реакцию АМ на конкретной территории.

Заключение. Выявленные тенденции характеризуют структуру воздействия состава ТВЧ атмосферного воздуха города на АМ. Исследование позволило выделить наиболее чувствительные критерии отклика АМ при контакте с ТВЧ воздушной среды (тиоредоксин, протеин-карбонил, 8-гидрокси-2'-деоксигуанозин).

Ключевые слова: микровзвеси атмосферного воздуха; органы дыхания; корреляция; альвеолярные макрофаги

Соблюдение этических стандартов. Исследование одобрено Этическим комитетом Владивостокского филиала ДНЦ ФПД – НИИМКВЛ, проведено в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123), директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/ЕС от 22.09.2010 г. о защите животных, использующихся для научных целей.

Для цитирования: Барскова Л.С., Виткина Т.И., Веремчук Л.В., Гвозденко Т.А. Оценка влияния состава микрочастиц атмосферного воздуха на окислительно-восстановительный гомеостаз альвеолярных макрофагов. *Гигиена и санитария*. 2022; 101(9): 1004–1010. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-9-1004-1010> <https://www.elibrary.ru/adauqy>

Для корреспонденции: Барскова Людмила Сергеевна, канд. мед. наук, мл. науч. сотр. лаб. медицинской экологии и рекреационных ресурсов Владивостокского филиала ДНЦ ФПД – НИИ МКВЛ, 690105, Владивосток. E-mail: pretty_people_2016@mail.ru

Участие авторов: Барскова Л.С. – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала; Виткина Т.И. – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала; Веремчук Л.В. – статистическая обработка; Гвозденко Т.А. – сбор данных литературы, ответственность за целостность всех частей статьи. Все соавторы – написание текста, редактирование, утверждение окончательного варианта статьи.

Благодарность. Авторы выражают благодарность к.б.н., доц. Н.Е. Зюмченко; к.б.н., доц. Н.П. Токмаковой; д.б.н., профессору РАН, члену-корреспонденту РАО К.С. Голохвасту.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила: 30.05.2022 / Принята к печати: 04.08.2022 / Опубликовано: 30.09.2022

Lyudmila S. Barskova, Tatyana I. Vitkina, Ludmila V. Veremchuk, Tatyana A. Gvozdenko

Assessment of the influence of the composition of atmospheric microparticles on redox homeostasis of alveolar macrophages

Vladivostok Branch of Far Eastern Scientific Centre of Physiology and Pathology of Respiration – Scientific Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Vladivostok, 690105, Russian Federation

Introduction. The components and dimensions of suspended particulate matter (SPM) depend on territory, the sources of generation.

The aim is to assess the relationship between the quality and dispersed composition of atmospheric SPMs with oxidative and antioxidant processes in alveolar macrophages.

Materials and methods. The impact of actual multi component pollution of the surface layer of atmospheric air on alveolar macrophages (AMs) of Wistar rats was modelled. Correlations between the characteristics of AMs and pollution were assessed using the Spearman correlation coefficient.

Results. The predominant contribution of the quality characteristics of SPM has been founded. The effect of the dispersed composition increases with an increase of the finely dispersed particles fraction. Metal particles have caused oxidative damage to lipids, with the formation of stable lipid products. The antioxidant system (AOS) has been characterized by the activation of compensatory response. Mineral components have caused irreversible oxidative damage to lipid and protein compounds, activating the thioredoxin formation. Soot particles have showed the most pathogenic effect, leading to oxidative damage to lipids, proteins, and nucleic acids. The AOS stress was accompanied by an increase in the formation of oxidized glutathione and thioredoxin, which performs restoration of proteins and DNA.

Limitations. Our study characterizes the response of the AMs of a particular territory.

Conclusion. The established tendencies characterize the impact of composition of SPMs of the urban atmospheric on AMs. The study made it possible to identify the most sensitive criteria for the response of AMs upon contact with atmospheric SPMs (thioredoxin, protein carbonyl, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine).

Keywords: micro-suspension of atmospheric air; respiratory system; correlation; alveolar macrophages

Compliance with ethical standards. The study was approved by the Ethics Committee of the Vladivostok branch of the Far Eastern Scientific Centre of Physiology and Pathology of Respiration – Scientific Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, conducted in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experiments or for other Scientific Purposes (ETS N 123), Directive of the European Parliament and the Council of the European Union 2010/63/EC dated September 22, 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

For citation: Barskova L.S., Vitkina T.I., Veremchuk L.V., Gvozdenko T.A. Assessment of the influence of the composition of atmospheric microparticles on redox homeostasis of alveolar macrophages. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2022; 101(9): 1004–1010. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-9-1004-1010> <https://www.elibrary.ru/advuqky> (In Russian)

For correspondence: Lyudmila S. Barskova, MD, PhD, Junior Researcher of Laboratory of Medical Ecology and Recreational Resources of Vladivostok Branch of Far Eastern Scientific Centre of Physiology and Pathology of Respiration – Scientific Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Vladivostok, 690105, Russian Federation. E-mail: pretty_people_2016@mail.ru

Information about authors:

Barskova L.S., <https://orcid.org/0000-0001-7582-343X> Vitkina T.I., <https://orcid.org/0000-0002-1009-9011>
Veremchuk L.V., <https://orcid.org/0000-0001-6372-6560> Gvozdenko T.A., <https://orcid.org/0000-0002-6413-9840>

Contribution: Barskova L.S. – the concept and design of the study, the collection and processing of material; Vitkina T.I. – the concept and design of the study, the collection and processing of material; Veremchuk L.V. – statistical processing; Gvozdenko T.A. – collection of literature data, responsibility for the integrity of all parts of the article. All authors are responsible for the writing of the text, editing, approval of the final version of the article.

Acknowledgement. The authors are grateful to PhD, Assoc. prof., N.E. Zyumchenko, PhD, Assoc. prof. N.P. Tokmakova, MD, PhD, DSci., Professor of the Russian Academy of Sciences, Corresponding Member of the Russian Academy of Education K.S. Golokhvast.

The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: May 30, 2022 / Accepted: August 04, 2022 / Published: September 30, 2022

Введение

Загрязнение окружающего воздуха твёрдыми взвешенными частицами (ТВЧ) вызывает краткосрочные и долгосрочные негативные последствия для здоровья. Эпидемиологические исследования выявили ассоциацию между воздействием атмосферных ТВЧ и развитием и обострением респираторных заболеваний. $PM_{2.5}$ являются наиболее опасными для человека, так как в их состав входят частицы нанодисперсного диапазона, обладающие особыми физико-химическими и биологическими свойствами. При оседании в дыхательных путях наночастицы способны преодолевать клеточную мембрану, альвеолярную перегородку, проникать в системный кровоток и головной мозг [1, 2]. Нормирование содержания в атмосферном воздухе PM_{10} и $PM_{2.5}$ основано на измерении массы частиц в единице объёма атмосферного воздуха без учёта их качественного состава. В то же время важно учитывать качественную составляющую ТВЧ, которая также определяет токсичность частиц. Компоненты ТВЧ и размерность частиц отличаются для различных территорий и зависят от источников генерации, поэтому необходимо изучение воздействия загрязнения атмосферного воздуха, характерного для определённой местности [3].

Другим важным аспектом проблемы является оценка ответной реакции со стороны организма на уровне клетки. Так как поступление ТВЧ из атмосферного воздуха возможно только путём ингалирования, то первым барьером является дыхательная система, которая наиболее открыта для подобного взаимодействия. Эпителий бронхов обеспечивает химический, иммунологический, механический защитный барьер, посредством мукоцилиарного клиренса происходит выведение ТВЧ, осевших на слизистой оболочке. В то же время ТВЧ могут достигать слоя нижележащих клеток и вызывать окислительный стресс [4, 5]. Вызванный истощением дисбаланс уровней антиоксидантов, таких как глутатион, аскорбат и токоферол, может привести к усилению окислительного стресса. Альвеолярные макрофаги (АМ) играют решающую роль в удалении ТВЧ из дыхательных путей. В свою очередь, постоянно фагоцитируя ТВЧ в течение длительных периодов времени при высоких уровнях загрязнения, АМ могут быть не способны размножаться и пополняться, снижая способность лёгких устранять вторгающиеся патогены [6].

Цель исследования – оценка связи качественного и дисперсного состава ТВЧ атмосферного воздуха с окислительными и антиоксидантными процессами в альвеолярных макрофагах.

Материалы и методы

Экспериментальное исследование проводили согласно биоэтическим принципам и стандартам содержания и этаназии животных, Международным стандартам по лабораторной практике и действующим нормативно-правовым актам Российской Федерации. Выведение животных из эксперимента осуществляли согласно принципам гуманности в соответствии с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных. Для отбора бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) [7] у 17 крыс-самцов линии Вистар использовали среду DMEM, содержащую телячью сыворотку, антибиотики и антимикотик. Для выделения АМ пробирки центрифугировали с охлаждением 10 мин. Супернатант сливали, осадок разводили 1 мл среды, полученную клеточную суспензию (альвеолярные макрофаги, эритроциты, лимфоциты, нейтрофилы) наслаивали на раствор перколлы, после центрифугирования отбирали на границе раздела фаз кольцо с макрофагами. Проводили подсчёт клеток, оценивали их жизнеспособность и доводили концентрацию до 100 тыс. клеток в 1 мл. Полученные от каждого животного АМ делили на 3 группы и культивировали при температуре +37 °C и 5%-м содержании углекислого газа в инкубаторе. Культуры клеток анализировали в течение всего эксперимента, используя инвертированный световой микроскоп Axio Observer A1 (Carl Zeiss, Германия) [8].

Для моделирования реального загрязнения атмосферного воздуха оценивали фракционный состав ТВЧ на двух различных по техногенной нагрузке территориях г. Владивостока [9]. Отбор проб атмосферного воздуха проводили по авторской методике в приземном слое [10], являющемся «зоной дыхания» и непосредственно воздействующем на респираторный тракт. Модельные взвеси (МВ), характеризующие поликомпонентное загрязнение взвешенными частицами атмосферного воздуха исследуемых территорий, были приготовлены на кафедре безопасности жизнедеятельности в техносфере ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет» под руководством д. б. н., профессора РАН

Таблица 1 / Table 1

Дисперсный состав модельных взвесей ТВЧ, %
Dispersion composition of model suspended solids (SS) suspensions, %

Модельная взвесь Model suspension	Дисперсность ТВЧ, мкм / SS dispersity, μm					
	0–0.1	0.1–1	1–2.5	2.5–10	10–100	100–1000
№ 1	0	1.6	3.3	17.3	77.5	0.3
	PM ₁ = 1.6	PM ₁ = 1.6				
	PM _{2.5} = 4.9	PM _{2.5} = 4.9	PM _{2.5} = 4.9			
	PM ₁₀ = 22.2	PM ₁₀ = 22.2	PM ₁₀ = 22.2	PM ₁₀ = 22.2	$\Sigma(> \text{PM}_{10}) = 77.8$	$\Sigma(> \text{PM}_{10}) = 77.8$
№ 2	8.1	19.7	6.3	36.3	29.6	0
	PM ₁ = 27.8	PM ₁ = 27.8				
	PM _{2.5} = 34.1	PM _{2.5} = 34.1	PM _{2.5} = 34.1			
	PM ₁₀ = 70.4	PM ₁₀ = 70.4	PM ₁₀ = 70.4	PM ₁₀ = 70.4	$\Sigma(> \text{PM}_{10}) = 29.6$	$\Sigma(> \text{PM}_{10}) = 29.6$

К.С. Голохваста. Для приготовления модельных взвесей ТВЧ обоих районов в качестве основных компонентов взяты сажа и пепел (МВ № 1 – 10%, МВ № 2 – 40%), минералы (МВ № 1 – 70%, МВ № 2 – 40%), металлы – по 10% в обеих МВ, синтетические и органические вещества – по 5% в обеих МВ. В качестве металлического компонента использованы микрочастицы оксидов железа и свинца, в качестве минералов – цеолитовый туф (смесь цеолита, кварца, полевого шпата, плагиоклаза, каолинита) Приморских месторождений. Пепел представлен аморфным крупнодисперсным углеродом, а сажа – нано- и мелкодисперсными частицами углерода. Для моделирования органической составляющей измельчали смесь листьев, травы, волос животных, перьев птиц – представителей биосферы данного региона. В качестве синтетических частиц были взяты крупнодисперсные частицы пластмассы [11]. Дисперсный состав МВ представлен в табл. 1. Нагрузку на АМ проводили на третий день от начала культивирования. Первую группу клеточек оставляли без нагрузки, во вторую группу АМ добавляли суспензию МВ № 1 (соответствовала району с низкой техногенной нагрузкой), в третью группу – суспензию МВ № 2 (соответствовала району с высокой техногенной нагрузкой). Полученные МВ добавляли в дозе 1 мкг на 100 тыс. клеток. Дозировку подбирали в соответствии с реальным уровнем загрязнения в пересчёте на объём дыхания, массу лёгких и количество АМ у человека и экспериментальных животных.

На пятый день эксперимента проводили отбор проб. Для ИФА и колориметрии использовали отдельно клеточную массу (культуру клеток – КК) и среду культивирования (КС). Определяли общую антиоксидантную активность (АОА, ммоль/л) (Randox Laboratories Ltd., UK), содержание гидропероксидов липидов (ГПЛ, усл. ед.) в гептан-изопропанольных экстрактах; малонового диальдегида (МДА, ммоль/л), протеин-карбонилла (ПК, нмоль/мг), тиоредоксина (Т, нг/мл), 8-гидрокси-2'-деоксигуанозина (8-ОХДГ, нг/мл) (Northwest Life Science Specialties, LLC, USA); глутатиона общего (Г_{общ}), восстановленного (Г_{восст}) и окисленного (Г_о) (мкмоль/л) (ArborAssays, USA) согласно инструкциям к наборам.

Влияние ТВЧ различной дисперсности и их качественных характеристик оценивали с позиции определения активности ответной реакции клеточных параметров. Для описания результатов применяли непараметрические методы статистической обработки. При расчёте взаимосвязей использовали программу Statistica 8.0 с отбором парных корреляций (Спирмена) r при $p < 0,05$. Исходя из доли компонентов в общей массе модельной взвеси значения составляющих выражали в абсолютных величинах. Один модуль составил анализ корреляционных взаимодействий клеточных параметров с дисперсным составом (0–0.1; 0.1–1 мкм, 1–2.5; 2.5–10; 10–100; 100–1000 мкм). Второй модуль учитывал корреляции с качественными характеристиками (сажа и пепел, минералы, металлы, синтетические и органические вещества).

Это позволило обозначить влияние каждого отдельного компонента (независимой переменной) модельной взвеси на анализируемые показатели (зависимые переменные). Использование такого подхода позволяет выявить потенциальные пути отклика альвеолярных макрофагов на воздействие поликомпонентного состава микровзвесей атмосферного воздуха.

Результаты

Полученные в экспериментальном исследовании результаты проанализированы на предмет наличия статистически значимостей зависимостей прооксидантно-антиоксидантных параметров АМ от дисперсного и качественного состава МВ. В культуре АМ, подвергнутых воздействию МВ № 1, идентичной району с незначительной техногенной нагрузкой, обнаружена корреляционная связь ГПЛ с тремя показателями МВ. Все связи средней силы, характеризуют зависимость уровня ГПЛ от содержания ТВЧ в диапазоне фракции 10–100 мкм ($r = 0,57$; $p = 0,003$) и её качественных характеристик: металлов ($r = 0,5$; $p = 0,06$) и минералов ($r = 0,64$; $p = 0,0006$). Выявлена зависимость пяти показателей окислительно-восстановительного гомеостаза в культуре АМ с составом МВ № 2, характеризующей загрязнение атмосферного воздуха района с высоким техногенным прессингом. На частицы размерностью 0,1–1 мкм, представленные сажой, реагировал уровень Т ($r = 0,5$; $p = 0,019$). С частицами размерностью 1–2,5 мкм, представленными сажой, выявлены связи трёх показателей: ГПЛ ($r = 0,41$; $p = 0,017$), Г_о ($r = 0,38$; $p = 0,025$), Т ($r = 0,7$; $p = 0,0007$). На частицы в диапазоне фракции 2,5–10 мкм ответили два показателя окислительно-восстановительного гомеостаза клетки: уровень Г_о ($r = 0,39$; $p = 0,0025$) и уровень Т ($r = 0,6$; $p = 0,018$). От качественной составляющей ТВЧ (сажа, пепел) в диапазоне 2,5–10 мкм выявлена зависимость четырёх показателей: общей АОА ($r = 0,46$; $p = 0,008$); Г_о ($r = 0,37$; $p = 0,007$); Г_{общ} ($r = 0,42$; $p = 0,014$); Т ($r = 0,48$; $p = 0,024$). С металлами размерностью 2,5–10 мкм в диаметре обнаружена корреляционная зависимость трёх показателей: ГПЛ ($r = 0,5$; $p = 0,049$); общей АОА ($r = 0,52$; $p = 0,004$) и Г_{общ} ($r = 0,51$; $p = 0,04$). Два показателя окислительно-восстановительного баланса клетки показали реакцию на фракцию ТВЧ с размерностью 10–100 мкм: Г_о ($r = 0,32$; $p = 0,015$) и Г_{общ} ($r = 0,38$; $p = 0,022$). Выявлена связь уровня ГПЛ ($r = 0,53$; $p = 0,003$) с минералами в этой размерности.

Оценка зависимости показателей окислительно-восстановительного баланса в культуральной среде АМ от состава МВ № 1 показала следующие результаты. На частицы с аэродинамическим диаметром 0,1–1 мкм, представленные сажой, отреагировал Т ($r = 0,37$; $p = 0,032$). Воздействие ТВЧ с размерностью 1–2,5 мкм, представляющих собой сажу, характеризовалось связью с двумя показателями: Т ($r = 0,6$; $p = 0,001$) и ПК ($r = 0,38$; $p = 0,027$). Дисперсный состав в

Таблица 2 / Table 2

Зависимость исследуемых показателей АМ от дисперсного и качественного состава МВ, %

Dependence of the studied alveolar macrophages (AM) indicators on the dispersion and qualitative composition, %

Показатель Indicators	Культура АМ AM culture		Культуральная среда АМ AM culture medium	
	Модельная взвесь / Model suspensions			
	№ 1	№ 2	№ 1	№ 2
Удельный вес качественного состава / Percentage of quality composition	66.7	61.1	62.5	52.6
Удельный вес дисперсного состава / Percentage of dispersion composition	33.3	38.9	37.5	47.4

диапазоне 10–100 мкм связан с образованием ПК ($r = 0,45$; $p = 0,013$). На металлические частицы с размерностью 10–100 мкм реагировали два параметра: ГПЛ ($r = 0,38$; $p = 0,026$) и МДА ($r = 0,46$; $p = 0,012$). Два показателя АМ ГПЛ ($r = 0,51$; $p = 0,026$) и ПК ($r = 0,47$; $p = 0,011$) были связаны с частицами в диапазоне 10–100 мкм минерального происхождения, на органические частицы этой размерности дал реакцию один показатель – ГПЛ ($r = 0,48$; $p = 0,008$). ТВЧ минерального происхождения с размерностью 100–1000 мкм были связаны с образованием МДА ($r = 0,46$; $p = 0,011$) и выработкой Т ($r = 0,52$; $p = 0,005$).

Выявленные в культуральной среде корреляционные связи параметров АМ с качественным и дисперсным составом МВ № 2 имеют тенденцию, аналогичную с культурой клеток. В культуральной среде третьей группы выявлена корреляционная связь фракции ультратонких частиц (0–0,1 мкм, сажа) с двумя показателями: АОА ($r = 0,43$; $p = 0,03$) и Т ($r = 0,54$; $p = 0,023$). Частицы в диапазоне 0,1–1 мкм (сажа) связаны с тремя показателями АМ: АОА ($r = 0,4$; $p = 0,019$), Т ($r = 0,57$; $p = 0,0012$); ПК ($r = 0,64$; $p = 0,0002$). Дисперсный и качественный состав ТВЧ 1–2,5 мкм (сажа) связан с одним параметром – Т ($r = 0,52$; $p = 0,015$). Обнаружена взаимосвязь четырёх показателей окислительно-восстановительного баланса АМ с фракционным составом частиц 2,5–10 мкм: ГПЛ ($r = 0,37$; $p = 0,027$), МДА ($r = 0,39$; $p = 0,022$), ПК ($r = 0,62$; $p = 0,015$) и 8-ОХДГ ($r = 0,63$; $p = 0,0031$). В то же время качественный состав частиц данной размерной фракции (ТВЧ от 2,5 до 10 мкм) имеет связь с показателями клетки: для сажи выявлены три связи: МДА ($r = 0,46$; $p = 0,009$), Γ_0 ($r = 0,36$; $p = 0,031$) и 8-ОХДГ ($r = 0,53$; $p = 0,0012$). Воздействие металлических частиц связано с образованием МДА ($r = 0,45$; $p = 0,01$), Γ_0 ($r = 0,37$; $p = 0,028$) и АОА ($r = 0,37$; $p = 0,028$). На частицы в диапазоне 10–100 мкм ответили два показателя: ГПЛ ($r = 0,43$; $p = 0,014$) и АОА ($r = 0,36$; $p = 0,009$). На минеральные частицы с размерностью 10–100 мкм ответили два клеточных параметра – ГПЛ ($r = 0,45$; $p = 0,002$) и МДА ($r = 0,4$; $p = 0,02$). Один показатель АМ – Γ_0 ($r = 0,37$; $p = 0,008$) был связан с частицами в диапазоне фракции 10–100 мкм органического происхождения. Вклад характеристик МВ в ответную реакцию показателей АМ в культуре клеток и культуральной среде представлен в табл. 2.

При нагрузке обемии МВ доля влияния качественных характеристик составила от 53 до 67%. Однако при воздействии МВ № 2 доля вклада дисперсного состава выше как в культуре клеток (39% против 33%), так и в культуральной среде АМ (47% против 37%).

Обсуждение

Проведённое исследование расширяет и углубляет имеющиеся представления о формировании окислительно-восстановительного гомеостаза альвеолярных макрофагов, в частности под воздействием модельных взвесей твёрдых микрочастиц, соответствующих реальному составу атмосферного воздуха районов с незначительным и высоким техногенным прессингом. В эксперименте изучена ответная реакция АМ на воздействие ТВЧ, загрязняющих атмосферный воздух в «зоне дыхания» районов г. Владивостока [5].

Корреляционный анализ позволил определить вклад качественного и дисперсного состава модельных взвесей в ответную реакцию клетки. Впервые показано, что качественные характеристики ТВЧ внесли больший вклад и в культуре клеток, и в культуральной среде. В то же время при увеличении доли мелкодисперсных ТВЧ происходит усиление влияния дисперсности на окислительно-восстановительные процессы АМ. Токсичность ТВЧ зависит как от качественного состава, так и от размерности частиц, причём дисперсность как количественная характеристика потенцирует действие химических составляющих. Чем мельче частицы, тем глубже они способны проникать в дыхательные пути, оказывая более выраженное воздействие [12].

Рассматривая влияние качественного состава МВ на ответную реакцию АМ, необходимо отметить следующие важные моменты. Поскольку минералы являются составляющими земной коры и распространены в окружающей среде повсеместно, минеральные частицы могут быть основным компонентом вдыхаемых частиц. Образованные как в результате естественных процессов, так и в процессе антропогенной деятельности, они представлены в атмосферном воздухе в различных размерных фракциях. Воздействие частиц природных минералов (базальт, кварц, габбро, милонит, полевой шпат) на АМ крыс формирует воспалительный процесс и может привести к фиброзу и даже мезотелиомам [13]. В недавнем исследовании R. Leinardi и соавт. показано, что патогенность кварца связана с лизосомными изменениями в АМ. Это событие запускает воспалительный каскад, который может привести к силикозу и, в конечном итоге, к раку лёгких [14]. В нашем исследовании впервые выявлены корреляционные связи параметров окислительной модификации и окислительного повреждения клеточных структур с минералами в непоглощаемой АМ размерности. При воздействии минеральных частиц в дисперсности от 10 до 100 мкм и в культуре клеток, и в культуральной среде выявлялась корреляция с образованием гидроперекисей липидов, причём данное воздействие характеризовалось их дальнейшим окислением и образованием МДА. Минералы в дисперсности свыше 100 мкм вызвали образование МДА и ПК, их обнаружение в культуральной среде свидетельствует о необратимых окислительных повреждениях липидных и белковых структур клетки. Корреляционной связи минерального компонента с откликом общей АОА обнаружено не было. Однако на данные частицы в непоглощаемой фракции реагировал тиоредоксин, необходимый вне клетки для восстановления повреждённых белковых молекул.

Пыль растительного и животного происхождения также является частью окружающей среды. В эксперименте *in vitro* на макрофагах человека получены провоспалительные эффекты данных частиц [15]. В нашем исследовании органический детрит был представлен в обеих МВ в одинаковой размерности. На органическую составляющую в размерности 10–100 мкм в культуральной среде обеих групп откликнулся показатель ГПЛ, характеризующий наличие обратимой окислительной модификации мембранных липидов клетки, что свидетельствует о минимальном патогенном воздействии данного компонента.

Пластмассы относятся к числу повсеместно распространённых стойких загрязнений антропогенного происхождения. Воздействие микроразмерных пластиков на лабораторных животных связано с различными формами воспаления, иммунологической реакцией, эндокринными нарушениями, изменением липидного и энергетического метаболизма [16]. В ограниченном количестве исследований *in vitro* была оценена токсичность наноразмерных пластиков [17]. В нашем исследовании синтетические частицы присутствовали в обеих МВ в одинаковой концентрации в размерности от 10 до 100 мкм. Отсутствие статистически значимой корреляционной связи с параметрами окислительно-восстановительного гомеостаза клетки свидетельствует о недостаточной активности АМ в отношении синтетических частиц в непоглощаемой размерности и о слабых окислительных свойствах использованных материалов.

В воздушной среде г. Владивостока наиболее представлены такие микрочастицы металлов, как оксиды железа и свинца [18]. Металлические частицы в МВ взяты в разных диапазонах размерности: в МВ № 1 – от 10 до 100 мкм, присутствующие в естественной среде; в МВ № 2 – в размерности 2,5–10 мкм, свойственной техногенному загрязнению. Высокой токсичностью обладают частицы в размерности грубодисперсной фракции, образованные в результате износа тормозов и шин. В крупных городах металлы часто встречаются в повторно взвешенной пыли вдоль дорог. Неоднократно в работах исследователей была показана окислительная активность металлических компонентов микрочастиц [19, 20]. Нашим исследованием установлено, что с наличием металлов в МВ во всех биологических средах взаимосвязаны продукты перекисного окисления липидов внутри клетки, а в культуральных средах обеих опытных групп – необратимые продукты окислительного повреждения липидных структур клетки. Полученные результаты указывают на важную роль металлов, которые, как известно, непосредственно участвуют в окислительно-восстановительных реакциях, приводящих к образованию вторичных окислителей, таких как АФК и свободные радикалы [21, 22]. Со стороны антиоксидантной системы (АОС) внутри клеток и во внеклеточной среде на металлические частицы в размерности 2,5–10 мкм откликнулся уровень АОА. $\Gamma_{\text{общ}}$ коррелировал в культуре клеток, а Γ_{o} – в культуральной среде. В работе К. Styszko и соавт. также отмечена сильная взаимосвязь истощения глутатиона с наличием свинца в PM_{10} [19]. Таким образом, наблюдалась выраженная компенсаторная ответная реакция АОС на металлические частицы с размерностью 2,5–10 мкм вследствие значительного образования АФК и свободных радикалов.

Основной компонент в обеих МВ в размерности частиц до 2,5 мкм составила сажа. Сажа и пепел были также представлены в размерности 2,5–10 мкм, в каждой МВ частицы представлены в разной концентрации. Поступление в атмосферный воздух ультратонких частиц обусловлено работой двигателей внутреннего сгорания и электростанций [23], что характерно и для г. Владивостока. Выхлопные газы автомобилей содержат продукты неполного сгорания топлива – сажу, состоящую из частиц углерода. Вдыхание сажи очень опасно для здоровья человека, так как эти частицы обладают высоким адсорбционным потенциалом, особенно в отношении тяжёлых углеводородов (бенз(а)пирен) [24]. В исследованиях D. Robinson показано негативное воздействие органического и элементарного углерода на респираторный тракт [25]. После воздействия углеродных частиц, образовавшихся в результате сжигания жидкого и твёрдого топлива, зафиксировано увеличение числа неотложных госпитализаций [26]. В нашем исследовании наиболее яркую ответную реакцию со стороны АМ (что выражалось в наибольшем количестве корреляционных связей) вызвало воздействие МВ № 2 с высоким удельным весом частиц до 2,5 мкм, идентичной загрязнению атмосферного воздуха района с высокой техногенной нагрузкой. Внутри клетки выявленные зависимости характерны в основном для работы АОС: увеличение концентрации сажи в диапазоне 1–2,5 и 2,5–10 мкм приво-

дит к повышению уровня Γ_{o} ; $\Gamma_{\text{общ}}$ и общая АОА откликнулись на дисперсность 2,5–10 мкм. Корреляция между истощением восстановленного глутатиона и органическим углеродом в PM_{10} ($r = 0,67$) и элементарным углеродом в составе $\text{PM}_{2,5}$ ($r = 0,57$) обнаружена и в исследовании Styszko K. и соавт. [19]. Нами показано, что наибольшее количество связей в культуре клеток выявлено у тиоредоксина. Наблюдался отклик для частиц во всех размерностях, причём при размерности 1–2,5 мкм выявлена сильная корреляционная связь. Однако не обнаружено корреляционной зависимости внутриклеточных параметров от содержания нанодисперсных частиц. Считается, что ультратонкие частицы не дают достаточно сильных сигналов, чтобы стимулировать хемотаксис макрофагов к ним [27]. В многочисленных исследованиях отмечено также, что фагоцитарная активность АМ оптимальна для частиц размером более 500 нм и менее эффективна для частиц в ультрадисперсном (< 100 нм) диапазоне. Noël A. и соавт. наблюдали в дыхательных путях рядом с эпителиальными клетками присутствие частиц сажи, которые не поглощались макрофагами даже через 10 дней после воздействия. Данное наблюдение подтверждает, что первые стадии опосредуемого АМ удаления, а именно обнаружение и распознавание осажённых частиц, являются неполными в течение 10 дней после воздействия [28]. Результаты нашего исследования показали, что при воздействии МВ с меньшим удельным весом $\text{PM}_{2,5}$ в культуре клеток отсутствовали корреляционные связи этих частиц с окислительно-восстановительными параметрами. Больше число фагоцитированных мелкодисперсных частиц (воздействие МВ № 2) приводило к напряжению антиоксидантной системы АМ: наблюдалось увеличение образования окисленных продуктов (Γ_{o}) и увеличение выработки Т, необходимого внутри клетки для восстановления белков, репарации ДНК и предотвращения апоптоза. В то же время в культуральной среде окислительное повреждение более выражено. Обнаруженные связи характеризуют окислительное повреждение липидов, белков, нуклеиновых кислот и нарушение целостности мембранных структур АМ. Наши результаты согласуются с исследованиями взаимосвязи химического состава и биологической активности с продукцией АФК *in vitro*, показавшими окислительные свойства элементарного и органического углерода [19, 29].

На основании полученных результатов впервые определены значимые показатели ответной реакции альвеолярных макрофагов на повреждающий фактор. Наиболее чувствительным критерием отклика тиолдисульфидзависимых антиоксидантных процессов является тиоредоксин, играющий ключевую роль в протекции клеток дыхательных путей от микрооксидантов за счёт репаративного действия и участвующий в редокс-регуляции, предотвращении апоптоза и хемотаксисе макрофагов. Содержание протеин-карбонила и 8-гидрокси-2'-деоксигуанозина, свидетельствующих о необратимых окислительных модификациях белковых и нуклеиновых клеточных структур, могут использоваться как индикаторы токсического повреждения клетки от воздействия мелкодисперсных фракций твёрдых частиц, взвешенных в атмосферном воздухе.

Заключение

В проведённом исследовании впервые показан отклик альвеолярных макрофагов на компоненты, характеризующие качественный и количественный состав микроаэрозоль, загрязняющих атмосферный воздух конкретной территории в реальных условиях. Применение корреляционного анализа позволило вычленивать преобладающий вклад качественного состава ТВЧ, в то же время увеличение в модельной взвеси количества мелкодисперсных частиц усиливает влияние дисперсного состава. Частицы металлов вызывали окислительное повреждение липидов с образованием необратимых продуктов в обеих опытных группах, со стороны АОС наблюдалась выраженная компенсаторная ответная реакция. Воз-

действие минералов приводило к необратимым окислительным повреждениям липидных и белковых структур, вызывая интенсификацию образования тиоредоксина, необходимого вне клетки для восстановления окисленного глутатиона и белковых молекул клеточной мембраны. Наибольшее патогенное воздействие, выявленное для частиц сажи, характеризовалось окислительным повреждением липидов, белков, нуклеиновых кислот и нарушением целостности мембран-

ных структур АМ. Напряжение функционирования АОС сопровождалось увеличением образования окисленного глутатиона и тиоредоксина, осуществляющего внутриклеточное восстановление белков и ДНК. Исследования в данной области позволяют выделить триггеры, обозначить наиболее чувствительные критерии отклика клеток органов дыхания при контакте с ТВЧ воздушной среды и в дальнейшем сформировать систему мер диагностики и профилактики.

Литература

(п.п. 1–4, 6, 9, 12–17, 19–21, 23–29 см. References)

- Виткина Т.И., Барскова Л.С., Зюмченко Н.Е., Токмакова Н.П., Гвозденко Т.А., Голохваст К.С. Баланс глутатионзависимых процессов в альвеолярных макрофагах крыс линии Wistar при воздействии твердых взвешенных частиц атмосферного воздуха. *Гигиена и санитария*. 2020; 99(2): 200–5. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2020-99-2-200-205>
- Целуйко С.С., Зиновьев С.В., Огородникова Т.Л. Микрометод культивирования альвеолярных макрофагов – новый способ диагностики бронхиальной астмы. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. 2001; (9): 15–6.
- Виткина Т.И., Голохваст К.С., Барскова Л.С., Зюмченко Н.Е., Токмакова Н.П., Гвозденко Т.А. Методологические подходы к экспериментальному исследованию воздействия микроразмерных взвесей атмосферного воздуха. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. 2019; 73: 80–6. <https://doi.org/10.36604/1998-5029-2019-73-80-86>
- Барскова Л.С., Виткина Т.И., Янькова В.И. Метод отбора и анализа проб атмосферного воздуха для определения фракционного состава твердых взвешенных частиц микроразмерного ряда. В кн.: *Материалы Международного Форума Научного совета Российской Федерации по экологии человека и гигиене окружающей среды «Экологические проблемы современности: выявление и предупреждение неблагоприятного воздействия антропогенно детерминированных факторов и климатических изменений на окружающую среду и здоровье населения»*. М.; 2017: 43–4.
- Голохваст К.С., Паничев А.М., Гульков А.Н., Чайка В.В. Способ приготовления стандартных образцов аэрозолей. Патент РФ № 2525427С2; 2012.
- Голохваст К.С. *Атмосферные взвеси городов Дальнего Востока*. Владивосток; 2013.
- Веремчук Л.В., Минева Е.Е., Виткина Т.И. Выбор функциональных методов исследования органов дыхания в оценке риска воздействия городской среды на пациентов с хронической обструктивной болезнью легких. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. 2018; 68: 23–8. https://doi.org/10.12737/article_5b189048ed62b6.15603461

References

- Veremchuk L.V., Vitkina T.I., Barskova L.S., Gvozdenko T.A., Mineeva E.E. Estimation of the size distribution of suspended particulate matters in the urban atmospheric surface layer and its influence on bronchopulmonary pathology. *Atmosphere*. 2021; 12(8): 1010. <https://doi.org/10.3390/atmos12081010>
- Kim K.H., Kabir E., Kabir S. A review on the human health impact of air-borne particulate matter. *Environ. Int.* 2015; 74: 136–43. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.10.005>
- Adams K., Greenbaum D.S., Shaikh R., van Erp Annemoon M., Russell A.G. Particulate matter components, sources, and health: Systematic approaches to testing effects. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 2015; 65(5): 544–58. <https://doi.org/10.1080/10962247.2014.1001884>
- Cooper D.M., Loxham M. Particulate matter and the airway epithelium: the special case of the underground. *Eur. Respir. Rev.* 2019; 28(153): 190066. <https://doi.org/10.1183/16000617.0066-2019>
- Vitkina T.I., Barskova L.S., Zyuchenko N.E., Tokmakova N.P., Gvozdenko T.A., Golokhvast K.S. Balance of glutathione-related processes in alveolar macrophages under exposure to suspended particulate matter of atmospheric air in of Wistar rats. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2020; 99(2): 200–5. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2020-99-2-200-205> (in Russian)
- Gangwar R.S., Bevan G.H., Palanivel R., Das L., Rajagopalan S. Oxidative stress pathways of air pollution mediated toxicity: Recent insights. *Redox Biol.* 2020; 34: 101545. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101545>
- Tseluyko S.S., Zinov'ev S.V., Ogorodnikova T.L. Alveolar macrophage culture micromethod – a new technique for bronchial asthma diagnostics. *Byulleten' fiziologii i patologii dykhaniya*. 2001; (9): 15–6. (in Russian)
- Vitkina T.I., Golokhvast K.S., Barskova L.S., Zyuchenko N.E., Tokmakova N.P., Gvozdenko T.A. Methodological approaches to the experimental study of the effects of micro-dimensional air suspensions. *Byulleten' fiziologii i patologii dykhaniya*. 2019; 73: 80–6. <https://doi.org/10.36604/1998-5029-2019-73-80-86> (in Russian)
- Barskova L.S., Vitkina T.I., Gvozdenko T.A., Veremchuk L.V., Golokhvast K.S. Assessment of air pollution by small-sized suspended particulate matter in urbanized territories with various technogenic load (on the example of Vladivostok, Russia). *Russ. Open Med. J.* 2019; 8(3): 0304. <https://doi.org/10.15275/rusomj.2019.0304>
- Barskova L.S., Vitkina T.I., Yankova V.I. A method for taking and analyzing atmospheric air samples to determine the fractional composition of suspended particulate matter of the microsize range. In: *Materials of the International Forum of the Scientific Council of the Russian Federation on Human Ecology and Environmental Hygiene «Environmental Problems of Our Time: Identification and Prevention of the Adverse Impact of Anthropogenically Determined Factors and Climatic Changes on the Environment and Public Health» [Materialy Mezhdunarodnogo Forumy Nauchnogo soveta Rossiyskoy Federatsii po ekologii cheloveka i gigiene okruzhayushchey sredy «Ekologicheskie problemy sovremenosti: vyavlenie i preduprezhdenie neblagopriyatnogo vozdeystviya antropogenno determinirovannykh faktorov i klimaticheskikh izmeneniy na okruzhayushchuyu sredy i zdorov'e naseleniya»]*. Moscow; 2017: 43–4. (in Russian)
- Golokhvast K.S., Panichev A.M., Gul'kov A.N., Chayka V.V. Method of preparation of standard samples of aerosols. Patent RF № 2525427С2; 2012. (in Russian)
- Valavanidis A., Fiotakis K., Vlachogianni T. Airborne particulate matter and human health: Toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. *J. Environ. Sci. Health. Part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 2008; 26(4): 339–62. <https://doi.org/10.1080/10590500802494538>
- Ilgren E.B., Breña M.O., Larragoitia J.C., Navarrete G.L., Breña A.F., Krauss E., et al. A reconnaissance study of a potential emerging Mexican mesothelioma epidemic due to fibrous zeolite exposure. *Indoor Built Environ.* 2008; 17(6): 496–515. <https://doi.org/10.1177/1420326X08096610>
- Leinardi R., Pavan C., Yedavally H., Tomatis M., Salvati A., Turci F. Cytotoxicity of fractured quartz on THP-1 human macrophages: role of the membranolytic activity of quartz and phagolysosome destabilization. *Arch. Toxicol.* 2020; 94(9): 2981–95. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02819-x>
- Viegas S., Caetano L.A., Korkalainen M., Faria T., Pacifico C., Carolino E., et al. Cytotoxic and inflammatory potential of air samples from occupational settings with exposure to organic dust. *Toxics*. 2017; 5(1): 8. <https://doi.org/10.3390/toxics5010008>
- Chen G., Feng Q., Wang J. Mini-review of microplastics in the atmosphere and their risks to humans. *Sci. Total Environ.* 2020; 703: 135504. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135504>
- Xu M., Halimu G., Zhang Q., Song Y., Fu X., Li Y., et al. Internalization and toxicity: A preliminary study of effects of nanoplastic particles on human lung epithelial cell. *Sci. Total Environ.* 2019; 694: 133794. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133794>
- Golokhvast K.S. *Atmospheric Suspensions in the Cities of the Far East of Russia [Atmosfernye vzvesi gorodov Dal'nego Vostoka]*. Vladivostok; 2013. (in Russian)
- Styszko K., Samek L., Szramowiat K., Korzeniewska A., Kubisty K., Rakoczy-Lelek R., et al. Oxidative potential of PM₁₀ and PM_{2.5} collected at high air pollution site related to chemical composition: Krakow case study. *Air Qual. Atmos. Health* 2017; 10(9): 1123–37. <https://doi.org/10.1007/s11869-017-0499-3>
- Hamad S.H., Schauer J.J., Antkiewicz D.S., Shafer M.M., Kadhim A.K. ROS production and gene expression in alveolar macrophages exposed to PM_{2.5} from Baghdad, Iraq: Seasonal trends and impact of chemical composition. *Sci. Total Environ.* 2016; 543(Pt. A): 739–45. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.065>
- Pardo M., Porat Z., Rudich A., Schauer J.J., Rudich Y. Repeated exposures to roadside particulate matter extracts suppresses pulmonary defense mechanisms, resulting in lipid and protein oxidative damage. *Environ. Pollut.* 2015; 210: 227–37. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.009>
- Veremchuk L.V., Mineeva E.E., Vitkina T.I. Choice of functional methods of study of the respiratory system at the assessment of the risk of the urban environment effect on patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Byulleten' fiziologii i patologii dykhaniya*. 2018; 68: 23–8. https://doi.org/10.12737/article_5b189048ed62b6.15603461 (in Russian)

23. Liang C.S., Duan F.K., He K.B., Ma Y.L. Review on recent progress in observations, source identifications and countermeasures of PM_{2.5}. *Environ. Int.* 2016; 86: 150–70. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.016>
24. Totlandsda A.I., Øvrevik J., Cochran R.E., Herseeth J.I., Bolling A.K., Lag M., et al. The occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives and the proinflammatory potential of fractionated extracts of diesel exhaust and wood smoke particles. *J. Environ. Sci. Health Part A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 2014; 49(4): 383–96. <https://doi.org/10.1080/10934529.2014.854586>
25. Robinson D.L. Composition and oxidative potential of PM_{2.5} pollution and health. *J. Thorac. Dis.* 2017; 9(3): 444–7. <https://doi.org/10.21037/jtd.2017.03.92>
26. Krall J.R., Mulholland J.A., Russell A.G., Balachandran S., Winquist A., Tolbert P.E., et al. Associations between source-specific fine particulate matter and emergency department visits for respiratory disease in four U.S. Cities. *Environ. Health Perspect.* 2017; 125(1): 97–103. <https://doi.org/10.1289/EHP271>
27. Landsiedel R., Ma-Hock L., Haussmann H.J., Van R.B., Kayser M., Wiench K. Inhalation studies for the safety assessment of nanomaterials: status quo and the way forward. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotech.* 2012; 4(4): 399–413. <https://doi.org/10.1002/wnan.1173>
28. Noël A., Xiao R., Perveen Z., Zaman H.M., Rouse R.L., Paulsen D.B., et al. Incomplete lung recovery following sub-acute inhalation of combustion-derived ultrafine particles in mice. *Part. Fibre Toxicol.* 2016; 13: 10. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0122-z>
29. Hamad S.H., Schauer J.J., Antkiewicz D.S., Shafer M.M., Kadhim A.K. ROS production and gene expression in alveolar macrophages exposed to PM_{2.5} from Baghdad, Iraq: Seasonal trends and impact of chemical composition. *Sci. Total Environ.* 2016; 543(Pt. A): 739–45. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.065>