

Отчет о проверке на заимствования №1



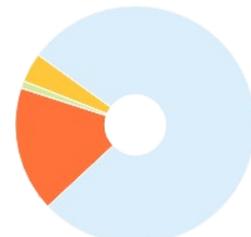
Автор: Барскова Людмила Сергеевна
Проверяющий: Клеутина Татьяна Александровна (tak051083@gmail.com / ID: 2)
Организация: Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания
 Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <http://cfpd.antiplagiat.ru>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 3
 Начало загрузки: 16.12.2020 03:19:48
 Длительность загрузки: 00:00:19
 Имя исходного файла: ДИСС.Барсковой Л.С. НИИ мед климатологии_01.10.2020(БЕЗ ЛИТЕРАТУРЫ).docx
 Название документа: ДИСС.Барсковой Л.С. НИИ мед климатологии_01.10.2020(БЕЗ ЛИТЕРАТУРЫ)
 Размер текста: 1 кБ
 Тип документа: Кандидатская диссертация
 Символов в тексте: 179238
 Слов в тексте: 20383
 Число предложений: 672

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Последний готовый отчет (ред.)
 Начало проверки: 16.12.2020 03:20:08
 Длительность проверки: 00:00:55
 Комментарии: не указано
 Поиск перефразирований: да
 Модули поиска: Модуль поиска ИПС "Адилет", Модуль выделения библиографических записей, Сводная коллекция ЭБС, Модуль поиска "Интернет Плюс", Коллекция РГБ, cfpd, Цитирование, Переводные заимствования (RuEn), Модуль поиска переводных заимствований по eLibrary (EnRu), Модуль поиска переводных заимствований по интернет (EnRu), Коллекция eLIBRARY.RU, Коллекция ГАРАНТ, Коллекция Медицина, Диссертации и авторефераты НББ, Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU, Модуль поиска перефразирований Интернет, Коллекция Патенты, Модуль поиска общеупотребительных выражений, Кольцо вузов, Переводные заимствования



ЗАИМСТВОВАНИЯ

16,6%

САМОЦИТИРОВАНИЯ

4,48%

ЦИТИРОВАНИЯ

0,89%

ОРИГИНАЛЬНОСТЬ

78,03%

Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.
Самоцитирования — доля фрагментов текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа, по отношению к общему объему документа.
Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.
Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.
 Заимствования, самоцитирования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа. Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в отчете	Источник	Ссылка	Актуален на	Модуль поиска
[01]	7,47%	РЕГУЛЯЦИЯ ТИОЛ-ДИСУЛЬФИДНЫМИ АНТИОКСИДАНТНЫМИ СИСТЕМАМИ ОКИС...	http://elibrary.ru	11 Фев 2020	Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU
[02]	3,58%	БАЛАНС ГЛУТАТИОНЗАВИСИМЫХ ПРОЦЕССОВ В АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГАХ К...	http://elibrary.ru	26 Мар 2020	Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU
[03]	1,56%	ОСОБЕННОСТИ ОТВЕТНОЙ РЕАКЦИИ АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ НА ВОЗДЕЙС...	http://elibrary.ru	21 Фев 2018	Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU
[04]	1,94%	РЕГУЛЯЦИЯ ТИОЛ-ДИСУЛЬФИДНЫМИ АНТИОКСИДАНТНЫМИ СИСТЕМАМИ ОКИС...	http://elibrary.ru	11 Фев 2020	Коллекция eLIBRARY.RU
[05]	0,9%	ОСОБЕННОСТИ ОТВЕТНОЙ РЕАКЦИИ АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ НА ВОЗДЕЙС...	http://elibrary.ru	21 Фев 2018	Коллекция eLIBRARY.RU
[06]	0,67%	БАЛАНС ГЛУТАТИОНЗАВИСИМЫХ ПРОЦЕССОВ В АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГАХ К...	http://elibrary.ru	26 Мар 2020	Коллекция eLIBRARY.RU
[07]	0,61%	Кыткова, Оксана Юрьевна Патофизиологические механизмы и биоокислительн...	http://dlib.rsl.ru	25 Окт 2019	Коллекция РГБ
[08]	0,58%	МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ИССЛЕДОВАНИЮ ВО...	http://elibrary.ru	11 Фев 2020	Коллекция eLIBRARY.RU
[09]	0,71%	не указано	не указано	раньше 2011	Модуль поиска общеупотребительных выражений
[10]	0,34%	МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ИССЛЕДОВАНИЮ ВО...	http://elibrary.ru	11 Фев 2020	Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU
[11]	0,14%	Дорофеева М.Н.	не указано	07 Июл 2020	Кольцо вузов
[12]	0,24%	ВЛИЯНИЕ МОДЕЛЬНЫХ ВЗВЕСЕЙ МИКРОРАЗМЕРНЫХ ТВЕРДЫХ ВЗВЕШЕННЫХ ЧА...	http://elibrary.ru	21 Фев 2018	Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU
[13]	0,39%	ВЛИЯНИЕ МОДЕЛЬНЫХ ВЗВЕСЕЙ МИКРОРАЗМЕРНЫХ ТВЕРДЫХ ВЗВЕШЕННЫХ ЧА...	http://elibrary.ru	21 Фев 2018	Коллекция eLIBRARY.RU
[14]	0,02%	Владивостокский филиал ФГБНУ "Дальневосточный научный центр физиологии и и...	http://niivl.ru	01 Окт 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"

[15]	0,08%	Ответная реакция митохондрий тромбоцитов и лейкоцитов здоровых людей на в...	http://elibrary.ru	22 Янв 2019	Коллекция eLIBRARY.RU
[16]	0%	Шатилов, Игорь Николаевич Оптимизация санаторно-курортного лечения больн...	http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2018	Коллекция РГБ
[17]	0%	ГВОЗДЕНКО ТАТЬЯНА АЛЕКСАНДРОВНА (к 50-летию со дня рождения).	http://elibrary.ru	15 Июн 2015	Коллекция eLIBRARY.RU
[18]	0%	Клинико-иммунологические особенности и прогнозирование тяжелой внебольн...	http://emll.ru	21 Дек 2016	Коллекция Медицина
[19]	0,09%	Паскова, Елена Владимировна Состояние гуморальных факторов иммунитета при...	http://dlib.rsl.ru	28 Янв 2020	Коллекция РГБ
[20]	0,22%	Материалы (1/5)	http://sysin.ru	13 Фев 2018	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[21]	0,07%	Вестник новых медицинских технологий. Том XVI, № 1, 2009	http://bibliorossica.com	26 Мая 2016	Сводная коллекция ЭБС
[22]	0%	Перфильев, Вячеслав Юрьевич Эффективность препаратов, повышающих чувств...	http://dlib.rsl.ru	19 Фев 2018	Коллекция РГБ
[23]	0%	Состояние системной гемодинамики и эластических свойств артерий у мужчин с ...	http://emll.ru	21 Дек 2016	Коллекция Медицина
[24]	0%	Патофизиологические механизмы и биоокислительная регуляция хронического ...	https://cfpd.amursu.ru	02 Окт 2018	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[25]	0%	https://cfpd.ru/svedeniya-ob-obrazovatelnoy-organizatsii/420_%D0%94%D0%9D%D0...	https://cfpd.ru	01 Окт 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[26]	0%	Скачать II часть (9/19)	http://byulleten.com	29 Янв 2017	Модуль поиска перефразирований Интернет
[27]	0,24%	Пешкова, Светлана Валерьевна Кардиогемодинамические расстройства у пациен...	http://dlib.rsl.ru	15 Июн 2020	Коллекция РГБ
[28]	0,19%	Демьяненко, Елена Владимировна Механизмы повреждения почек при иммобил...	http://dlib.rsl.ru	08 Июл 2020	Коллекция РГБ
[29]	0%	Вестник новых медицинских технологий. Том XVIII, № 3, 2011	http://bibliorossica.com	26 Мая 2016	Сводная коллекция ЭБС
[30]	0%	Вестник новых медицинских технологий. Том XVIII, № 4, 2011	http://bibliorossica.com	26 Мая 2016	Сводная коллекция ЭБС
[31]	0%	Ермоленко, Екатерина Владимировна Состав, биологическая активность и способ...	http://dlib.rsl.ru	14 Июл 2017	Коллекция РГБ
[32]	0%	Тезисы XI международного конгресса «Санаторно-курортное лечение»	https://medlit.ru	26 Дек 2016	Коллекция Медицина
[33]	0%	Т. 25, № 4	http://emll.ru	28 Апр 2017	Коллекция Медицина
[34]	0%	Т. 93, № 5, сентябрь-октябрь	http://emll.ru	28 Апр 2017	Коллекция Медицина
[35]	0%	не указано	http://ksma.ru	28 Янв 2017	Модуль поиска перефразирований Интернет
[36]	0,06%	ВОЗМОЖНОСТИ СКРИНИНГОВОЙ ДИАГНОСТИКИ ВЕГЕТАТИВНОЙ РЕГУЛЯЦИИ И ...	http://elibrary.ru	раньше 2011	Коллекция eLIBRARY.RU
[37]	0,06%	Влияние модельных взвесей микроразмерных твердых взвешенных частиц атмос...	https://yandex.ru	13 Ноя 2018	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[38]	0%	не указано	http://icarp.su	01 Окт 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[39]	0,15%	ОСОБЕННОСТИ ПРОДУКЦИИ ТИОРЕДОКСИНА В КУЛЬТУРЕ АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКР...	http://elibrary.ru	17 Янв 2019	Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU
[40]	0%	Оценка результативности 2013-2015 Клиническая медицина	http://cfpd.amursu.ru	25 Июл 2017	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[41]	0,01%	Механизмы повреждения почек при иммобилизационном стрессе и возможност...	http://ma.cfuv.ru	01 Окт 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[42]	0,1%	Суменкова, Дина Валерьевна Участие липопротеинов высокой плотности и аполи...	http://dlib.rsl.ru	30 Июл 2012	Коллекция РГБ
[43]	0,13%	ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ГИДРОПЕРОКСИДОВ ЛИПИДОВ В АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МА...	http://elibrary.ru	27 Мая 2019	Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU
[44]	0%	Исследование информационно-значимых симптомов хронического тонзиллита и...	http://emll.ru	28 Апр 2017	Коллекция Медицина
[45]	0%	Архив. Международный онлайн-форум: Санаторно-курортное лечение: современ...	https://aqmt.ru	16 Дек 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[46]	0,1%	Совершенствование системы оказания медицинской помощи работникам желез...	http://emll.ru	21 Дек 2016	Коллекция Медицина
[47]	0,06%	Фауна цикадовых (Hemiptera: Fulgoroidea & Cicadomorpha) Беларуси: таксоном...	http://dep.nlb.by	04 Июл 2017	Диссертации и авторефераты НББ
[48]	0,14%	ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС И ЕГО РАЗНОВИДНОСТИ В ПАТОГЕНЕЗЕ АРТЕРИАЛЬНОЙ...	http://elibrary.ru	07 Янв 2018	Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU
[49]	0,03%	Тушканов, Алексей Сергеевич Термически и химически неравновесные процессы...	http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2019	Коллекция РГБ
[50]	0%	Эффективность лечения гиперпластических процессов эндометрия у женщин реп...	http://emll.ru	08 Июл 2017	Коллекция Медицина
[51]	0,02%	Химико-аналитический отдел ФБУН "Уфимский НИИ медицины труда и экологи...	http://uniim.rosпотrebнадzor.ru	01 Окт 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[52]	0%	Загрузить этот файл PDF (1/2)	http://medlit.ru	29 Окт 2019	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[53]	0%	Котова, Валентина Евгеньевна Определение компонентов нефтепродуктов в донн...	http://dlib.rsl.ru	22 Окт 2020	Коллекция РГБ
[54]	0%	Гигиеническая оценка загрязнения атмосферного воздуха мелкодисперсными тв...	http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации и авторефераты НББ
[55]	0%	Скачать автореферат	http://gabrich.ru	01 Окт 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"

[56]	0,05%	Лечение заболеваний слизистой оболочки полости рта у людей пожилого и старч...	http://medical-diss.com	01 Окт 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[57]	0,02%	Оценка загрязнения воздушного бассейна г. Набережные Челны промышленны...	не указано	26 Мая 2015	Кольцо вузов
[58]	0,07%	Шаповаленко, Наталья Сергеевна диссертация ... кандидата медицинских наук : 14...	http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2011	Коллекция РГБ
[59]	0,1%	не указано	не указано	раньше 2011	Цитирование
[60]	0,01%	http://nczd.ru/wp-content/uploads/2019/07/diss-chemakina.pdf	http://nczd.ru	01 Окт 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[61]	0%	О территориальной программе государственных гарантий бесплатного оказания...	http://docs.cntd.ru	01 Окт 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[62]	0%	Серебрякова Е.Н.	не указано	22 Мая 2015	Кольцо вузов
[63]	0%	Диссертация: "Совершенствование технологии возделывания яровой твердой п...	https://referat.bookap.info	01 Окт 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[64]	0%	ОЦЕНКА И ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПРИРОДНО-ТЕХНОГЕННЫХ СИСТЕМ, НАРУШЕННЫ...	http://diss.seluk.ru	14 Дек 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[65]	0%	Диссертация на тему «Биоэнергетическая оценка возделывания и использования ...	https://dissercat.com	01 Окт 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[66]	0%	Хабибулина, Людмила Романовна Клинико-аллергологическая характеристика п...	http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2018	Коллекция РГБ
[67]	0,08%	О РОЛИ ТИОЛДИСУЛЬФИДНОЙ СИСТЕМЫ В ЗАЩИТЕ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА ОТ ...	http://medlit.ru	20 Янв 2020	Коллекция Медицина
[68]	0,08%	Гигиеническая оценка загрязнения атмосферного воздуха мелкодисперсными тв...	http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации и авторефераты НББ
[69]	0%	https://www.tltsu.ru/sveden/document/Othet_o_samoobsledovanii_19.4.18.pdf	https://tltsu.ru	01 Окт 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[70]	0,08%	ОСНОВНЫЕ МАРКЕРЫ ДИЗРЕГУЛЯЦИИ ИММУННОЙ, ЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМ И ...	http://dsslib.net	16 Дек 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[71]	0%	Жук Д.С. диссертация	не указано	08 Июн 2017	Кольцо вузов
[72]	0%	дис жук финал 4.2	не указано	28 Июн 2017	Кольцо вузов
[73]	0%	дис жук финал 4.3	не указано	18 Июл 2017	Кольцо вузов
[74]	0,06%	ЕГИСУ НИОКТР	https://rosrid.ru	01 Окт 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[75]	0%	Доклады на научных конференциях, семинарах и т.п.-2017 СГУ - Саратовский гос...	https://sgu.ru	09 Окт 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[76]	0%	Доклады на научных конференциях, семинарах и т.п.-2017 СГУ - Саратовский гос...	https://sgu.ru	01 Окт 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[77]	0%	Доклады на научных конференциях, семинарах и т.п.-2017 СГУ - Саратовский гос...	https://sgu.ru	01 Окт 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[78]	0,05%	Смирнова, Мария Сергеевна Создание искусственного белка-антигена оболочки ...	http://dlib.rsl.ru	31 Янв 2014	Коллекция РГБ
[79]	0%	ВЯТКИН Алексей Александрович КОМБИНИРОВАННАЯ АНЕСТЕЗИЯ НА ОСНОВЕ КС...	http://diss.seluk.ru	03 Дек 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[80]	0%	ВЛИЯНИЕ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В УСЛ...	http://diss.seluk.ru	01 Окт 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[81]	0%	https://vmeda.mil.ru/upload/site56/document_file/Zgh1W1iTIR.pdf	https://vmeda.mil.ru	01 Окт 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[82]	0%	Соломашенко, Наталья Ивановна диссертация ... кандидата медицинских наук : 14...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция РГБ
[83]	0%	Атеф Абдельмохсен Абдельрахман Ахмед диссертация ... кандидата биологически...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция РГБ
[84]	0%	Бадаева, Алла Анатольевна Нарушения микробиоты влагалища при беременност...	http://dlib.rsl.ru	27 Дек 2019	Коллекция РГБ
[85]	0%	Салина, Елена Геннадьевна Транскриптомика Mycobacterium tuberculosis в состоя...	http://dlib.rsl.ru	19 Авг 2020	Коллекция РГБ
[86]	0%	Оценка информативности новых неинвазивных методов стратификации риска вн...	http://emll.ru	20 Дек 2016	Коллекция Медицина
[87]	0%	Роль инсулинорезистентности в развитии эндотелиальной дисфункции и наруше...	http://emll.ru	20 Янв 2020	Коллекция Медицина
[88]	0%	Обоснование применения янтарной кислоты для инфузивной терапии у больных ...	http://emll.ru	20 Янв 2020	Коллекция Медицина
[89]	0%	Эффективность индивидуальной гигиены полости рта с использованием различн...	http://dep.nlb.by	06 Дек 2018	Диссертации и авторефераты НББ
[90]	0%	Сенсорные нарушения при болезни Паркинсона: патогенез, клиника, диагностика	http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации и авторефераты НББ
[91]	0%	Комплексная терапия и коррекция кислородзависимых процессов деструктивных...	http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации и авторефераты НББ
[92]	0%	диссер_12_PB.docx	не указано	05 Окт 2020	Кольцо вузов
[93]	0,07%	http://downloads.igce.ru/journals/PEMME/PEMME_2018/PEMME_2018_3/Revich_B_A_...	http://downloads.igce.ru	01 Окт 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[94]	0%	http://downloads.igce.ru/journals/PEMME/PEMME_2018/PEMME_2018_3/Revich_B_A_...	http://downloads.igce.ru	01 Окт 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[95]	0%	THE CHANGES IN THE PROFILE OF CYTOKINES IN PROGRESSING CHRONIC OBSTRUCTI...	https://research-journal.org	16 Дек 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[96]	0%	Астма и ожирение царев	https://rasyanavl.ru	01 Окт 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[97]	0,07%	Лукина, Сардаана Анатольевна Формирование ценностного отношения к здоров...	http://dlib.rsl.ru	27 Дек 2019	Коллекция РГБ
[98]	0,04%	МАТЕРИАЛЫ РЕГИОНАЛЬНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ СТУДЕНТ...	https://docplayer.ru	18 Фев 2019	Модуль поиска "Интернет Плюс"

[99]	0%	Универсальный медицинский справочник. Все болезни от А до Я	http://ibooks.ru	09 Дек 2016	Сводная коллекция ЭБС
[100]	0%	https://vmeda.mil.ru/upload/site56/document_file/23Fxs31jBg.pdf	https://vmeda.mil.ru	01 Окт 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[101]	0%	Шипунова, Ирина Николаевна Иерархическая структура стромального микрокр...	http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2018	Коллекция РГБ
[102]	0%	Компьютерная томография в диагностике обструктивных болезней легких	http://emll.ru	20 Янв 2020	Коллекция Медицина
[103]	0%	Функционально-метаболическая перестройка альвеолярных макрофагов под вли...	http://dep.nlb.by	11 Ноя 2016	Диссертации и авторефераты НББ
[104]	0%	Комплексная оценка и коррекция менопаузальных нарушений у женщин в постм...	http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации и авторефераты НББ
[105]	0%	Диагностика и хирургическое лечение внутренних панкреатических свищей при ...	http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации и авторефераты НББ
[106]	0%	Обеспеченность организма витамином D у пациентов с хронической сердечной ...	http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации и авторефераты НББ
[107]	0,04%	Т. 1	http://emll.ru	28 Апр 2017	Коллекция Медицина
[108]	0,06%	Сборник "САМ - 2016"	http://cfpd.amursu.ru	29 Янв 2017	Модуль поиска перефразирований Интернет
[109]	0%	татаринаова наталя кирилловна Дисс. 2.doc	не указано	21 Сен 2017	Кольцо вузов
[110]	0%	татарнова наталя кирилловна Дисс. 3.doc	не указано	21 Сен 2017	Кольцо вузов
[111]	0%	татаринаова наталя кирилловна Дисс. 3.doc	не указано	21 Сен 2017	Кольцо вузов
[112]	0%	Моторов, Владимир Радимович Оценка канцерогенного риска для населения Рес...	http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2019	Коллекция РГБ
[113]	0,03%	Разработка методического инструментария оценки инновационного развития ву...	http://dslib.net	01 Окт 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[114]	0%	Разработка методического инструментария оценки инновационного развития ву...	http://dslib.net	01 Окт 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[115]	0%	Новости / РязГМУ	http://rzgmu.ru	01 Окт 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[116]	0,01%	Диагностика и специфическая профилактика респираторных и желудочно-кишеч...	http://dslib.net	16 Дек 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[117]	0,05%	Решение Арбитражного суда Приморского края от 15 мая 2008 г. по делу N А51-47...	http://arbitr.garant.ru	29 Дек 2016	Коллекция ГАРАНТ
[118]	0%	https://ac.gov.ru/files/publication/a/15600.pdf	https://ac.gov.ru	07 Апр 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[119]	0,05%	Методические указания МУК 4.1.3487-17 "Измерение концентрации угольной пыл...	https://garant.ru	01 Окт 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[120]	0%	Полный текст	http://cfpd.amursu.ru	раньше 2011	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[121]	0%	Динамика ноцицептивной чувствительности и цитокинового профиля крови у кр...	http://nphys.ru	01 Окт 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[122]	0%	Морфометрическая характеристика органов женской репродуктивной системы п...	http://dissers.ru	16 Дек 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[123]	0%	ГОСТ Р 56929-2016 Выбросы загрязняющих веществ в атмосферу. Исследование ф...	http://docs.cntd.ru	16 Дек 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[124]	0,03%	Proteomics analysis of Pro-inflammatory Cytokine-stimulated human lung fibroblasts a...	https://core.ac.uk	16 Дек 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[125]	0%	ASSA	http://assa.bionet.nsc.ru	16 Дек 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[126]	0%	ASSA	http://assa.bionet.nsc.ru	01 Окт 2020	Модуль поиска "Интернет Плюс"
[127]	0,03%	Аверина К.Н., Борисов А.А., Воробьев Н.И., Воробьева Л.В., Майборода В.А., Гудцов...	http://ivo.garant.ru	10 Апр 2019	Коллекция ГАРАНТ

ВЛАДИВОСТОКСКИЙ ФИЛИАЛ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ «ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ФИЗИОЛОГИИ
И ПАТОЛОГИИ ДЫХАНИЯ» – НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ МЕДИЦИНСКОЙ КЛИМАТОЛОГИИ И
ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ЛЕЧЕНИЯ

На правах рукописи

Барскова Людмила Сергеевна

**ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ
НАРУШЕНИЯ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНЫХ
ПРОЦЕССОВ В АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГАХ КРЫС ЛИНИИ
ВИСТАР ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ТВЕРДЫХ ВЗВЕШЕННЫХ ЧАСТИЦ
РАЗЛИЧНОЙ ДИСПЕРСНОСТИ**

14.03.03 – Патологическая физиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор РАН

Татьяна Александровна Гвозденко

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор РАН

Татьяна Исааковна Виткина

Владивосток – 2020

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	47	4
Глава 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ЖИВОЙ ОРГАНИЗМ ТВЕРДЫХ ВЗВЕШЕННЫХ МИКРОЧАСТИЦ, ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ АТМОСФЕРНЫЙ ВОЗДУХ (обзор литературы)		16
1.1. Влияние загрязнения воздушной среды на здоровье населения.....		16
1.2. Характеристики твердых взвешенных частиц, обуславливающие их патологические свойства при воздействии.....		20
1.3. Нарушения прооксидантно-антиоксидантного баланса клеток дыхательных путей, в результате воздействия взвешенных в атмосферном воздухе твердых микрочастиц		25
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ		36
2.1. Методы оценки загрязнения атмосферного воздуха взвешенными в приземном слое твердыми микрочастицами.....		36
2.2. Методы экспериментальных исследований (<i>in vitro</i>).....		43
2.2.1. Получение культуры альвеолярных макрофагов		43
2.2.2. Культивирование альвеолярных макрофагов и нагрузка модельными взвесями твердых микрочастиц.....		45
2.3. Лабораторные методы исследований		47
2.3.1. Оценка параметров процесса пероксидации		47
2.3.2. Определение показателей системы антиоксидантной защиты.....		48
2.4. Информационно-аналитические методы.....		49
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ		50
3.1. Оценка фракционного состава твердых микрочастиц, взвешенных в приземном слое атмосферного воздуха города Владивостока.....		50
3.2. Оценка прооксидантных процессов в альвеолярных макрофагах крыс линии Вистар при нагрузке модельными взвесями		55

3.3. Антиоксидантные защитные и репаративные механизмы в альвеолярных макрофагах крыс линии Вистар.....	63
3.4. Взаимосвязь показателей прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза альвеолярных макрофагов с характеристиками модельных взвесей.....	70
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	81
ВЫВОДЫ.....	103
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	105
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	106
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	127

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Загрязнение атмосферного воздуха до сих пор остается острой глобальной проблемой, так как и в настоящее время является одним из самых опасных экологических факторов риска для здоровья населения [30, 50, 57, 98, 147, 161]. По сведениям Всемирной организации здравоохранения около 7 миллионов человек ежегодно умирают из-за загрязнения атмосферного воздуха [48]. Особую опасность представляют твердые взвешенные частицы (ТВЧ), загрязняющие атмосферный воздух [91, 112, 114, 145], причем наиболее негативное влияние на здоровье оказывают нано- и микроразмерные частицы техногенного происхождения [107, 133]. При вдыхании ТВЧ с диаметром менее 10 мкм (PM₁₀ от англ. particulate matter) областью оседания являются различные отделы дыхательных путей. Частицы диаметром менее 2,5 мкм (PM_{2,5}) могут достигать дистальных отделов легкого и оседать в бронхиолах и альвеолах [19, 60]. В настоящее время во многих странах Европы, Северной Америки и отдельных странах Азии общепринята оценка содержания PM₁₀ и PM_{2,5} в атмосферном воздухе. В Российской Федерации повсеместный контроль за содержанием ТВЧ в атмосферном воздухе ведется по суммарной массовой концентрации частиц, определяемой гравиметрическим методом [44], по оценке дисперсного состава имеются отдельные исследования [1, 21, 33, 38]. В эпидемиологических исследованиях установлена связь микроразмерных ТВЧ с заболеваниями сердечно-сосудистой системы [76, 97, 159, 159, 169], доказано повышение риска развития и прогрессирования болезней органов дыхания [57, 145, 160], таких как бронхиальная астма [67, 167], хроническая обструктивная болезнь легких [82], фиброз и рак легких [122, 130]. Имеются убедительные доказательства того, что ТВЧ микро- и наноразмерного диапазона адсорбируют на своей поверхности токсичные вещества, пенетрирующие вместе с ними через клеточные барьеры, что приводит к циркуляции и накоплению микротоксикантов в органах и тканях

вследствие замедленного выведения из организма [152, 161]. $PM_{2,5}$ недавно признаны в качестве одной из основных причин смерти и инвалидности во всем мире. В группе риска – дети, пожилые люди и пациенты с респираторными и сердечно-сосудистыми заболеваниями [41, 54, 64, 96, 104, 133, 167].

Дыхательная система наиболее открыта для проникновения частиц, взвешенных в воздушном пространстве. Структурные и функциональные особенности респираторного тракта обеспечивают наибольшую площадь соприкосновения с атмосферным воздухом, локализованные здесь альвеолярные макрофаги (AM) первыми контактируют с микрочастицами, выполняя защитную функцию [25]. Поскольку от размера частиц зависит их способностью проникать во внутреннюю среду организма, то опасность неблагоприятного воздействия микро- и наноразмерных частиц несомненно выше, чем при вдыхании крупноразмерных поллютантов [50]. После оседания в респираторном тракте, ТВЧ [72, 150] и непосредственно альвеолярные макрофаги могут способствовать повышенному образованию активных форм кислорода, что ведет к развитию окислительного стресса [53, 106, 123], локальному повреждению клеток и системному воспалительному ответу [150]. Важными факторами в механизмах антиоксидантной защиты от патологического воздействия ТВЧ являются активность внутриклеточной системы и способность восстановить физиологические уровни АФК и поврежденные клеточные структуры в крайне неблагоприятных окислительно-восстановительных условиях [29, 43, 106, 113]. Реакции тиол-дисульфидного обмена защищают организм от разрушительного воздействия окислительного стресса [102]. Тиолдисульфидное звено антиоксидантной системы представлено, главным образом, системой глутатиона и тиоредоксина [24]. Редокс-опосредованные структурные и функциональные тиоловые модификации являются значимыми антиокислительными молекулярными механизмами [62]. Тиолдисульфидная система играет важную роль в протекции клетки, выполняя антиоксидантную функцию, защищает и восстанавливает структуру белков, является ключевым фактором в репарации ДНК, а также регулирует клеточный сигналинг и

взаимодействует с транскрипционными факторами.

Степень разработанности темы исследования

Многочисленные исследования загрязнения атмосферного воздуха подтверждают разнообразие качественного и количественного состава ТВЧ, как природного, так и техногенного происхождения [55, 124]. В основном, эти исследования посвящены качественной составляющей частиц и/или изучению частиц конкретной размерности [66, 146]. В доступных литературных источниках отсутствуют исследования загрязнения твердыми микрочастицами, взвешенными в приземном слое атмосферного воздуха, что является немаловажным фактором, так как характеризует именно «зону дыхания». Также, ни в отечественной, ни в зарубежной литературе нами не обнаружены исследования гранулометрического распределения ТВЧ в воздушной среде, позволяющие охарактеризовать весь дисперсный состав частиц в диапазонах размерности, выделенных в зависимости от точки осаждения в легких, эффективности элиминации, возможных механизмов воздействия. Оценка фракционного состава ТВЧ, характерного для различных по техногенной нагрузке урбанизированных территорий, и моделирование воздействия позволяет изучить ответную реакцию организма на патогенное воздействие частиц.

В литературных источниках освещены некоторые аспекты токсичности естественных компонентов и преимущественно отдельных техногенных компонентов атмосферных взвесей [81, 87, 143, 158, 165]. Активно ведутся зарубежные исследования по изучению окислительного потенциала ТВЧ, характеризующего биологические эффекты воздействия частиц [59, 124, 125, 126, 143, 157]. Тем не менее, в работах зарубежных исследователей не рассматривается комплексная ответная реакция основных гомеостатических систем организма на воздействие микро- и наноразмерных ТВЧ на клеточно-молекулярном уровне. В Российской Федерации подобных исследований практически нет, основное внимание отечественных ученых сосредоточено на эпидемиологических исследованиях [22, 32, 41]. Первой мишенью

повреждающего действия микрочастиц являются органы дыхания, где с помощью альвеолярных макрофагов происходит распознавание и первичная обработка вдыхаемых патогенов атмосферного воздуха, их изоляция посредством фагоцитоза, нейтрализация поглощенных веществ и последующее удаление из ткани легкого [2]. В настоящее время нет точных сведений о комплексной ответной реакции альвеолярных макрофагов на воздействие ТВЧ различной дисперсности. Изучение непосредственного воздействия микрочастиц на альвеолярные макрофаги *in vitro* даст возможность установить более тонкие механизмы окислительно-восстановительного гомеостаза клеток дыхательных путей организма. В работах отечественных и зарубежных исследователей отсутствуют такие сведения. Таким образом, несмотря на многочисленные исследования патогенетической роли окислительного стресса в развитии респираторных заболеваний [70, 74, 95, 140], изучение механизмов воздействия атмосферных микрочастиц в условиях урбанизированной территории при разной техногенной нагрузке и оценка ответной реакции на клеточно-молекулярном уровне являются важными исследовательскими проблемами.

Все вышесказанное послужило основанием для проведения данного научного исследования, определило его цель и основные задачи.

Цель исследования

Установить *in vitro* особенности ответной реакции альвеолярных макрофагов крыс линии Вистар на воздействие твердых взвешенных частиц различной дисперсности по состоянию окислительно-восстановительных процессов; выделить биоиндикаторы токсического повреждения клеток.

Задачи исследования

1. Оценить фракционный состав микроразмерных твердых взвешенных частиц (ТВЧ) приземного слоя атмосферного воздуха в двух районах г. Владивостока с различным уровнем техногенного загрязнения и разработать идентичные по составу модельные взвеси микроразмерных частиц;

2. Оценить интенсивность процессов перекисного окисления липидов, белков и ДНК в макрофагах бронхоальвеолярного лаважа крыс линии Вистар при воздействии модельных взвесей ТВЧ по содержанию гидроперекисей липидов, малонового диальдегида, протеин карбонила и 8-гидрокси-2'-деоксигуанозина *in vitro*;
3. Изучить ответную реакцию тиолдисульфидного звена системы антиоксидантной защиты макрофагов бронхоальвеолярного лаважа крыс линии Вистар *in vitro*;
4. Выявить особенности формирования нарушений окислительно-восстановительного гомеостаза макрофагов бронхоальвеолярного лаважа крыс линии Вистар в зависимости от дисперсного и качественного состава воздействующих модельных взвесей микроразмерных частиц;
5. Выделить биоиндикаторы токсического повреждения клетки в результате воздействия мелкодисперсных фракций ТВЧ атмосферного воздуха.

Научная новизна

Впервые установлены особенности фракционного распределения микроразмерных ТВЧ приземного слоя атмосферного воздуха в различных по техногенной нагрузке районах г. Владивостока. Район с повышенным уровнем загрязнения воздушной среды характеризуется высоким содержанием частиц PM_1 и $PM_{2,5}$.

Установлены механизмы ответной реакции системы «перекисное окисление – антиоксидантная защита» АМ. Ответная реакция клетки обусловлена содержанием в модельных взвесах частиц, фагоцитируемых альвеолярными макрофагами и способных усиливать выработку АФК.

Показана зависимость образования гидроперекисей липидов, малонового диальдегида, протеин карбонила и 8-гидрокси-2'-деоксигуанозина, характеризующих окислительное повреждение альвеолярных макрофагов, от дисперсного и качественного состава модельных взвесей. Доля вклада качественных характеристик микрочастиц в формирование нарушений окислительно-восстановительного гомеостаза составила от 52,6% до 66,7%, при

увеличении в модельной взвеси количества мелкодисперсных частиц происходит усиление влияния фракционного состава ТВЧ.

Установлены особенности реагирования тиолдисульфидного звена антиоксидантной системы альвеолярных макрофагов на воздействие модельных взвесей с различным дисперсным составом микрочастиц. Повышение содержания тиоредоксина, формирующего антиоксидантный и репаративный эффект в ответ на развитие окислительного стресса в альвеолярных макрофагах, обусловлено увеличением количества ТВЧ мелкодисперсных фракций, в наибольшей степени с размерностью от 1,0 до 2,5 мкм.

Выделены индикаторы раннего токсического повреждения клеток при воздействии твердых взвешенных частиц приземного слоя атмосферного воздуха в экспериментальных исследованиях на культуре макрофагов бронхоальвеолярного лаважа крыс линии Вистар *in vitro*. Выявлено, что протеин карбонил проявляет наибольший отклик на частицы в диапазоне фракции от 0,1 до 1,0 мкм, а 8-ОХДГ – от 2,5 до 10,0 мкм.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость диссертационной работы заключается в установлении молекулярных механизмов развития окислительного стресса в фагоцитирующих клетках бронхоальвеолярного лаважа экспериментальных животных в результате воздействия ТВЧ различной дисперсности. Установлено, что ответная реакция клетки обусловлена содержанием в модельных взвесах частиц, фагоцитируемых АМ и способных усиливать выработку АФК. На основе полученных знаний о нарушении окислительно-восстановительных процессов в альвеолярных макрофагах при воздействии частиц показано усиление влияния фракционного состава при увеличении доли мелкодисперсных фракций ТВЧ. В результате экспериментальных исследований доказана многокомпонентная роль тиоредоксиновой системы в антиоксидантном ответе АМ, протекции клеток от микротоксикантов за счет репаративного действия, участия в редокс-регуляции, предотвращении апоптоза и хемотаксисе макрофагов, причем значительное увеличение концентрации

тиоредоксина происходит при воздействии ТВЧ мелкодисперсных фракций. Полученные результаты также могут быть использованы при дальнейшем изучении этиологии и патогенеза формирования окислительного стресса под воздействием ТВЧ в условиях загрязнения атмосферного воздуха урбанизированных территорий.

Практическое значение имеет определение дисперсного состава ТВЧ приземного слоя атмосферного воздуха города Владивостока для выделения характерного для районов с различной техногенной нагрузкой превалирования содержания микрочастиц в выделенных патофизиологических диапазонах размерности. С целью определения гранулометрического состава взвешенных микрочастиц разработана авторская методика для проведения отбора проб приземного слоя атмосферного воздуха. Показана информативность определения уровня протеин карбонила и 8-ОХДГ в качестве ранних индикаторных критериев окислительного повреждения клеток и макромолекул при воздействии мелкодисперсных частиц атмосферного воздуха. Выявленные механизмы ответной реакции основных гомеостатических систем клетки могут быть использованы в формировании подходов к разработке программ профилактики нарушений, вызванных воздействием микрочастиц атмосферного воздуха.

Материалы и выводы диссертации защищены 4 свидетельствами о государственной регистрации патентных продуктов Российской Федерации, представлены в 3 разработанных методических документах, внедрены в учебный процесс кафедры клеточной биологии и генетики Школы естественных наук Дальневосточного федерального университета и Учебного центра Владивостокского филиала ДНП ФПД – НИИ медицинской климатологии и восстановительного лечения (2 акта внедрения).

Методология и методы исследования

Данное исследование является фрагментом плановой НИР Владивостокского филиала Федерального государственного бюджетного

научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» – НИИ медицинской климатологии и восстановительного лечения (№ гос. регистрации 01201352066). В экспериментальном исследовании (*in vitro*) предметом изучения являются культура альвеолярных макрофагов, выделенных из бронхоальвеолярного лаважа интактных крыс линии Вистар, и приземный слой атмосферного воздуха двух различающихся по техногенной нагрузке районов города Владивостока. Основными методологическими принципами настоящей работы явились комплексность и целостность, обеспеченные использованием взаимодополняющих методов исследования; репрезентативность, адекватные методы статистического инструментария обусловили достоверность полученных результатов и обоснованность научных положений и выводов, подтверждающиеся объективностью проведенного исследования. Исследование расширяет и углубляет имеющиеся представления о формировании окислительно-восстановительного гомеостаза альвеолярных макрофагов под воздействием модельных взвесей твердых микрочастиц различной дисперсности, соответствующих атмосферному воздуху районов с незначительным и высоким техногенным прессингом. Работа представляет собой фундаментальное научное исследование. Показана роль тиоредоксина в условиях нарушения окислительно-восстановительного гомеостаза клетки при воздействии твердых взвешенных частиц мелкодисперсных фракций. Изучение механизма пероксидации позволяет выделить индикаторы раннего повреждения клеток в результате воздействия микрочастиц атмосферного воздуха. В работе применялись гранулометрические, экспериментальные, лабораторные методы исследования и математико-статистическая обработка данных. Протокол экспериментального исследования рассмотрен и одобрен комитетом по биомедицинской этике Владивостокского филиала ДНЦ ФПД – НИИ медицинской климатологии и восстановительного лечения.

Положения, выносимые на защиту

1. Содержание ТВЧ приземного слоя атмосферного воздуха урбанизированной территории с высокой техногенной нагрузкой

характеризуется значительным количеством высокопатогенных частиц PM_{10} и $PM_{2,5}$, оказывающих наиболее патогенное воздействие на организм человека. Преобладание фракции с размерностью более 10 мкм характерно для территории с незначительной техногенной нагрузкой.

2. Выраженную окислительную модификацию липидных, белковых и генетических структур макрофагов БАЛ и развитие окислительного стресса вызывает модельная взвесь, идентичная по составу частиц воздушной среде территории с высоким техногенным прессингом. Содержание протеин карбонила и 8-ОХДГ в культуральной среде свидетельствует о необратимом повреждении клетки в результате воздействия мелкодисперсных фракций ТВЧ.

3. Повышение уровня тиоредоксина в ответ на увеличение количества мелкодисперсных частиц необходимо для протекции клеток в условиях интенсификации окислительного стресса. При увеличении доли мелкодисперсных фракций происходит усиление влияния дисперсного состава ТВЧ на ответную реакцию системы «перекисное окисление – антиоксидантная защита».

Степень достоверности и апробация результатов

Подтверждением достоверности полученных результатов являются достаточный репрезентативный объем наблюдений, исследования основных показателей окислительно-восстановительного гомеостаза альвеолярных макрофагов проведены с использованием современных лабораторных методов, для определения фракционного состава ТВЧ атмосферного воздуха использован гранулометрический метод, позволяющий оценить весь размерный спектр частиц. Статистическая обработка полученных данных адекватна поставленным задачам, использованы методы статистического анализа на основе программных пакетов «Statistica 8.0». Сформулированные задачи соответствуют цели исследования. Результаты, положения и выводы аргументированы и логически вытекают из анализа полученных данных.

Основные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на II и III Международном Форуме Научного совета Российской Федерации по

экологии человека и гигиене окружающей среды (Москва, 2017, 2018); Всероссийской научной конференции «Мониторинг состояния и загрязнения окружающей среды. Основные результаты и пути развития» (Москва, 2017); XXII и XXIII Международной научной конференции «Здоровье нации – XXI век» (Подгорица, 2018; Баку, 2019); 23rd and 24th Congress of the Asian Pacific Society of Respirology (APSR) (Taipei, 2018; Hanoi, 2019); XIII и XV Тихоокеанском медицинском конгрессе с международным участием (Владивосток, 2016, 2018); XXVIII Национальном конгрессе по болезням органов дыхания (Москва, 2018); XX Международной научно-практической конференции «Города России: проблемы строительства, инженерного обеспечения, благоустройства и экологии» (Пенза, 2018); Восьмой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Новосибирск, 2018); XXIV Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2018» (Санкт-Петербург, 2018); XXV Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием (Санкт-Петербург, 2019); VIII Съезде врачей-пульмонологов Сибири и Дальнего Востока (Благовещенск, 2019); Региональной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных по естественным наукам (Владивосток, 2019).

Личное участие автора

Личный вклад автора заключается в проведении научно-информационного поиска, обобщении данных литературы по теме исследования, теоретическом обосновании проблемы, проведении всех этапов исследования, получении и интерпретации первичных данных, статистической обработке материала, формулировке выносимых на защиту положений, выводов, написании и оформлении текста диссертации.

Публикации

По теме диссертации опубликована 31 научная работа, из них 11 статей (5 в изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Минобрнауки РФ, в то числе 1 статья индексируется в международных базах

цитирований WoS и Scopus, 1 статья – в Scopus). Получено 4 свидетельства о государственной регистрации патентных продуктов, опубликовано 3 информационно-методических пособия.

Благодарности

Автор благодарит научных руководителей: д.м.н., профессора РАН Т.А. Гвозденко, д.б.н., профессора РАН Т.И. Виткину, зам. директора по научной работе НИИМКВЛ д.б.н., профессора Т.П. Новгородцеву за помощь и поддержку на протяжении всех этапов исследования. Автор признателен К.С. Голохвасту – д.б.н., профессору РАН, профессору кафедры безопасности жизнедеятельности в техносфере, научному руководителю НОЦ нанотехнологии Инженерной школы ФГАОУ ВО «Дальневосточный Федеральный университет» за предоставленные модельные взвеси. Автор выражает благодарность к.б.н., доц. Н.Е. Зюмченко и к.б.н., доц. Н.П. Токмаковой (кафедра клеточной биологии и генетики Школы естественных наук ФГАОУ ВО «Дальневосточный Федеральный университет») 37 за неоценимую помощь при проведении экспериментальной части исследования и обсуждении полученных результатов. Автор благодарен к.б.н., доц. В.И. Яньковой за помощь при проведении исследований на начальном этапе работы и признателен д.б.н. Л.В. Веремчук за помощь, внимание и теплую атмосферу. Искренняя благодарность всему коллективу лаборатории биомедицинских исследований. Автор выражает свою признательность коллегам за полезные советы, важные замечания и комментарии при 60 обсуждении материалов исследования.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 135 машинописных страницах, содержит 21 таблицу и 9 рисунков. Структурно 9 работа состоит из введения, 4-х 7 глав (обзор отечественной и зарубежной литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение результатов исследований), выводов, 42 списка сокращений, списка цитируемой литературы, состоящего из 171 источника

(47 публикаций отечественных и 124 публикации зарубежных авторов) и приложения.

ГЛАВА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ЖИВОЙ ОРГАНИЗМ ТВЕРДЫХ ВЗВЕШЕННЫХ МИКРОЧАСТИЦ, ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ АТМОСФЕРНЫЙ ВОЗДУХ

(обзор литературы)

1.1. Влияние загрязнения воздушной среды на здоровье населения

Загрязнение воздушной среды является одним из главных факторов риска от воздействий окружающей среды для здоровья населения [30, 31, 42, 50, 57, 131, 147] и определено как девятый из шестидесяти семи факторов риска для установленной инвалидности [50, 98]. Загрязнение атмосферного воздуха ассоциировано с миллионами случаев преждевременной смерти во всем мире, 25% из которых являются, по оценкам, респираторного происхождения [60, 163]. Регламентированным критерием загрязненности атмосферного воздуха является содержание твердых взвешенных частиц (ТВЧ). Достоверно установлена их связь с заболеваниями органов дыхания [57, 145, 160]: бронхиальная астма, хроническая обструктивная болезнь легких, рак легких, [67, 82, 122, 130], а также с заболеваниями нервной [121] и сердечно-сосудистой систем [76, 97, 159, 169]. Воздействие твердых взвешенных частиц связывают с повышением риска развития острых цереброваскулярных инсультов; заболевания дыхательной и сердечно-сосудистой систем характеризуются утяжелением течения, значительным числом обострений, снижением качества жизни [137]. Эпидемиологические исследования доказали взаимосвязь загрязнения воздуха твердых взвешенных частиц со снижением уровня здоровья [39, 91, 97, 169, 170], но многие механизмы этого процесса до конца не ясны.

Переносимые по воздуху на огромные расстояния, мелкодисперсные частицы, вследствие своих физических характеристик, вносят вклад в загрязнение атмосферы далеко от источника образования [98]. Опасность

неблагоприятного воздействия взвешенных веществ на организм человека определяется совокупностью характеристик ТВЧ, и в исследованиях наблюдается изменение величины последствий для здоровья населения согласно местоположению и времени года. Форма, элементный состав, массовая концентрация и размерность частиц, загрязняющих атмосферный воздух, широко изменяются во времени и пространстве. Твердые взвешенные частицы адсорбируют на своей поверхности токсичные вещества, попадающие вместе с ними при вдыхании непосредственно в бронхолегочную систему [152].

Классификация ТВЧ для гигиенической оценки дисперсности и влияния на здоровье человека основана на способности частиц с определенным диапазоном аэродинамического диаметра проникать в различные отделы дыхательных путей. Наиболее важными для изучения являются трахеобронхиальная и респирабельная фракции. Трахеобронхиальную фракцию составляют вдыхаемые частицы менее 10 мкм в диаметре (PM_{10}), попадающие за пределы гортани, но не проникающие в нижние дыхательные пути. К респирабельной фракции относятся частицы менее 2,5 мкм в диаметре ($PM_{2,5}$) [19]. $PM_{2,5}$ являются наиболее патогенными частицами, так как способны оседать в бронхиолах, альвеолах и легочных капиллярах, а также попадать в системный кровоток, напрямую оказывая местное воздействие на различные ткани [132].

По современным представлениям ультрадисперсные частицы (меньше 0,1 мкм в диаметре ($PM_{0,1}$) или ультратонкие частицы – ultrafine particles (UFP)) способны проходить через клеточные мембраны. Вследствие внедрения в клетку UFP нарушают ее нормальное функционирование и энергетическое состояние. Невозможность быстрого выведения микроразмерных ТВЧ из организма приводит к их хроническому накоплению в органах и тканях, оказывая негативное воздействие в долгосрочной перспективе [89, 116]. Доказано токсическое воздействие ультратонких частиц на дыхательную, сердечно-сосудистую, репродуктивную и центральную нервную системы и связанную с этим высокую потенциальную способность к клеточной токсичности, генотоксичность, канцерогенность [56, 116, 151, 158, 161].

В нанотоксикологических исследованиях было продемонстрировано, что UFP могут осаждаться в полости носа, поглощаться обонятельным эпителием и перемещаться в мозг через гематоэнцефалический барьер. Этот путь воздействия загрязнения воздуха может быть связан с индукцией нейродегенеративных заболеваний человека (болезни Альцгеймера и Паркинсона) [121].

Среди ключевых компонентов загрязнения атмосферного воздуха $PM_{2,5}$ были недавно признаны в качестве одной из основных причин смерти и инвалидности во всем мире [96]. Показано, что увеличение загрязнения воздуха этими микрочастицами на каждые 10 мкг/м^3 увеличивает, примерно, на 6% риск смерти от сердечно-легочных причин и на 8% – от рака легких [51]. В исследованиях на крысах было обнаружено, что $PM_{2,5}$ преимущественно осаждаются в цитоплазме альвеолярного эпителия дистальных отделов легкого. Более того, количество частиц, осажденных в легких, увеличивалось по мере увеличения концентрации $PM_{2,5}$. Однако, так же сообщалось о неблагоприятном влиянии на респираторный тракт у здоровых и восприимчивых лиц всех возрастов при уровнях воздействия ТВЧ ниже стандартов качества атмосферного воздуха. Показана взаимосвязь воздействия самых низких уровней концентрации микрочастиц с увеличивающейся заболеваемостью и смертностью от патологий органов дыхания [97]. В наибольшей степени подвержены неблагоприятному воздействию микрочастиц, загрязняющих воздух, дети и пожилые люди, больные с уже имеющимися заболеваниями дыхательной и сердечно-сосудистой систем [41, 54, 64].

В настоящее время ведутся активные исследования кратковременного и долговременного воздействия загрязнения воздушной среды твердыми взвешенными частицами. Как показывают результаты, зависимость долговременного воздействия $PM_{2,5}$ с уровнем смертности изменяется у различных источников выбросов [110]. Важным вопросом в данных исследованиях является влияние различающихся уровней загрязнения на здоровье населения. Выявлена связь возрастания числа посещений детьми

отделений неотложной помощи по причине инфекций верхних дыхательных путей и астмы с увеличением концентрации $PM_{2,5}$ до 10 мкг/м^3 [134].

Эпидемиологические исследования не выявили пороговую концентрацию, ниже которой содержание ТВЧ в атмосферном воздухе не оказывает влияния на здоровье населения. Возможно, что для человеческой популяции характерен широкий диапазон чувствительности, таким образом, определенные категории населения подвергаются риску даже при самой невысокой концентрации ТВЧ [31, 105, 106, 161]. Таким образом, на текущий момент нет доказательств, что для микрочастиц есть безопасный уровень воздействия, при котором отсутствуют негативные последствия для здоровья.

В основу обеспечения благоприятных условий для населения, охраны здоровья и окружающей среды положено нормирование качества атмосферного воздуха. В Европе и США повсеместно проводится мониторинг фракций PM_{10} и $PM_{2,5}$. На текущий момент на территории Российской Федерации установлены критерии уровней загрязнения воздушной среды по твердым взвешенным частицам $PM_{2,5}$ и PM_{10} [9], однако регулярный мониторинг микрочастиц проводится только в отдельных мегаполисах. В рамках научных исследований выполнены изыскания по определению фракционного состава твердых взвешенных веществ в атмосферном воздухе селитебных территорий [1, 21, 38]. В этих исследованиях показано, что зона загрязнения атмосферного воздуха с учетом дисперсности ТВЧ характеризуется большей площадью, чем без учета фракционного деления частиц пылевых выбросов промышленных предприятий.

1.2. Характеристики твердых взвешенных частиц, обуславливающие их патологические свойства при воздействии

Вещества, загрязняющие атмосферу, охватывают широкий спектр физически и химически разнообразных взвешенных в воздухе частиц. Эти аэрозоли характеризуются различным происхождением, распределением частиц по размерам, химическим составом, механизмами формирования, атмосферным поведением. Твердые взвешенные частицы образуются в результате природного и антропогенного процессов. Естественный процесс включает в себя такие явления, как извержения вулканов, эрозия почв, спонтанные лесные пожары, образование морских спреев. Основными источниками антропогенных выбросов в атмосферу являются, главным образом, различные виды транспорта, промышленные источники, такие как добыча полезных ископаемых, сварка, производство электроэнергии, строительство. Любая форма сжигания топлива (угля, древесины, газа, бензина и дизельного топлива, полученных из нефти) формирует твердые взвешенные частицы, вследствие чего в воздушной среде можно обнаружить значительное количество разных типов частиц [55].

Важнейшей характеристикой частиц является размер, зависящий для первичных аэрозолей от источников образования, для вторичных аэрозолей – от атмосферной динамики. От аэродинамического диаметра твердых взвешенных частиц зависит как время их пребывания в атмосферном воздухе, так и их экологическая опасность. Более крупные частицы оседают на поверхность земли на протяжении нескольких часов рядом с источниками образования. Более мелкие частицы до двадцати суток остаются в нижних слоях атмосферы, распространяясь на большие расстояния от источника происхождения [58]. Размер также играет значимую роль при проникновении в респираторный тракт человека, так как он определяет специфику взаимодействия твердых взвешенных частиц с клетками и точку осаждения в легких. В легком человека осаждение аэрозоля идет за счет сочетания гравитационного

осадкообразования, инерционного воздействия и броуновской диффузии [79, 101].

Частицы грубой фракции PM_{10} (2,5–10 мкм) образуются, в основном, при эрозии почвы, из строительного мусора, дорожной пыли и биоаэрозолей (грибы, эндотоксины, бактерии и пыльца). Тонкая фракция ($PM_{2,5}$) и ультратонкие частицы происходят, главным образом, от прямых выбросов в результате процессов сгорания, таких, как сжигание древесины, использование ископаемого топлива транспортными средствами и горение угля [55].

Источники образования ТВЧ определяют как элементный, так и дисперсный состав атмосферных взвесей. В отличие от грубой фракции PM_{10} , мелкодисперсные частицы с размерностью до 2,5 мкм переносятся на значительные расстояния, присутствуют в воздухе длительное время, проникают глубоко в респираторный тракт, легко преодолевают защитные барьеры человеческого организма. Респирабельная фракция ($PM_{2,5}$) способна попадать в альвеолы, бронхиолы и участвующие в газообмене легочные капилляры. Наночастицы (ультратонкие) с самой высокой проникающей способностью: преодолевают гематоэнцефалический барьер, проходят через клеточные мембраны, выявляются в ядре клетки [152, 106, 161]. Ультратонкие частицы разносятся системным кровотоком, способствуя хроническому накоплению в различных органах и тканях и долговременному негативному воздействию на организм [56, 116, 151, 161]. Одним из изученных источников наноразмерных частиц являются двигатели внутреннего сгорания, генерирующие продукты неполного сгорания топлива [146]. Форма ультратонких частиц также непосредственно определяет проникающую способность частиц и чаще всего обусловлена кристаллической структурой. Наноразмерные частицы обладают совершенно другими физико-химическими свойствами в отличие от крупнодисперсных частиц [52]. Такие уникальные свойства, как очень низкая масса, сверхвысокая реактивность, отношение увеличенной площади поверхности к массе обуславливают более серьезные неблагоприятные последствия для здоровья человека [69]. Увеличение площади

поверхности частиц на единицу концентрации экспоненциально повышает их биологическую активность, в том числе за счет увеличения адсорбционных свойств, возможность для взаимодействия с клетками и течения прямой биологической реакции [114, 135]. Одним из возможных вариантов респираторного поглощения UFP является осаждение на поверхности обонятельной луковицы [72].

В дополнение к размеру и концентрации, качественный состав микрочастиц оказывает значительное влияние на токсичность [78]. Большая доля от общей массы микрочастиц, загрязняющих атмосферный воздух, представлена малотоксичными компонентами природного происхождения. В то же время, следовые компоненты (например, некоторые органические вещества, переходные металлы) вносят незначительный вклад в общую массу взвешенных веществ, однако могут быть факторами, обуславливающими токсичность ТВЧ. Источники образования обуславливают качественный состав микрочастиц, в наибольшей степени опасны твердые взвешенные частицы техногенного генеза, имеющие в своем составе такие токсичные компоненты, как микрочастицы металлов (особенно переменной валентности, интенсифицирующие образование АФК), органические соединения (включая полициклические ароматические углеводороды), биологические материалы (бактериальные эндотоксины, аллергены) [71, 106, 163]. В исследованиях Robinson (2017) показано негативное воздействие на респираторный тракт органического и элементарного углерода [148], увеличение числа неотложных госпитализаций зафиксировано после воздействия углеродных частиц, образовавшихся в результате сжигания жидкого и твердого топлива [66]. В патогенезе легочного воспаления, вызванного микрочастицами, активное участие принимают такие неорганические компоненты, как металлы, (свинец, бром, ванадий) и органический углерод. Для них зафиксирована сильная связь с формированием в легких воспалительной реакции [155].

Опубликованы данные исследований по изучению токсичности природных компонентов, обнаруживаемых в атмосферных взвесах – кварца,

эрионита, алюмосиликатов и некоторых других [165, 171]. Частицы различных пород (базальт, кварц, габбро, милонит, полевой шпат) вызывали при воздействии на альвеолярные макрофаги крыс ответные реакции воспаления [84]. Однако в этих работах не рассматриваются проблемы влияния микрочастиц минералов на клеточном уровне.

В работах некоторых исследователей показано различие окислительных свойств частиц, загрязняющих атмосферный воздух, как между территориями, так и внутри регионов [124, 126, 157]. В качестве критерия, описывающего биологический отклик на воздействие частиц, в некоторых работах предлагается использовать оценку окислительного потенциала. Для этого применяют анализ дитиотреитола (показателя рассчитанного на объем воздуха), анализ антиоксидантов, выявляемых на поверхности легких (восстановленного глутатиона и аскорбиновой кислоты). Окислительный потенциал является интегральной характеристикой способности микрокомпонентов воздушной среды окислять молекулы-мишени, так как объединяет ответ на такие важные свойства, как размер, поверхностный заряд, площадь поверхности и химический состав.[126]. Выявлено, что присутствующие в твердых взвешенных частицах водорастворимые металлы, при длительном воздействии в условиях городской среды являются одними из основных факторов как местной, так и системной воспалительной реакции [143]. В исследовании Styszko et al. (2017) определено наличие прямой сильной корреляционной зависимости между металлическими и углеродсодержащими компонентами твердых взвешенных частиц и окислительным потенциалом [125]. В окислительный потенциал значительный вклад также вносят сорбированные на твердых взвешенных частицах ароматические полициклические углеводороды и хиноны [59, 65]. Окислительный потенциал может рассматриваться с позиции влияния уровней загрязнения воздушной среды ТВЧ с конкретной размерностью. Установлено, что даже небольшие концентрации $PM_{2,5}$ индуцируют острые респираторные заболевания [97]. Анализ окислительного потенциала для водорастворимых компонентов показал, что пик у частиц с

размерностью 1–2,5 мкм достигался за счет ионов переходных металлов и органических составляющих. Окислительный потенциал у компонентов, нерастворимых в воде, был повышенным у частиц с размерностью до 0,1 мкм и в диапазоне фракции 2,5–6,0 мкм. Исследование показывает, что осаждение микрочастиц происходит в разных областях респираторного тракта. Глубоко в легкие проникали вещества органического происхождения и хиноны, а преимущественно в верхних областях оседали ионы переходных металлов. Несмотря на то, что окислительный потенциал наиболее высок при воздействии наночастиц, депонирование твердых взвешенных частиц в разных отделах легких может вызывать различные биологические отклики [61].

Микрочастицы могут действовать через разные биологические пути. ТВЧ могут опосредовать неблагоприятное воздействие на здоровье, индуцируя генерацию активных форм кислорода макрофагами, посредством активации клеточных сигнальных путей и повреждения барьерной функции легких и антиоксидантной защиты, каждая из которых может приводить к изменению функции легких. Кроме того, клеточные взаимодействия, в результате воздействия ТВЧ, могут являться причиной эпигенетических модификаций, приводя к повреждению в экспрессии гена. К этому можно добавить, что активация множества клеточных сигнальных путей приписывается специфическим составляющим ТВЧ. Поэтому ТВЧ от разных источников могут приводить к различным ответам, что делает изучение воздействия ТВЧ атмосферного воздуха отличающихся по техногенной нагрузке регионов важным и актуальным объектом для дальнейших исследований.

1.3. Нарушения прооксидантно-антиоксидантного баланса клеток дыхательных путей, в результате воздействия взвешенных в атмосферном воздухе твердых микрочастиц

Структурные и функциональные особенности респираторного тракта обеспечивают наибольшую площадь соприкосновения с атмосферным воздухом, локализованные здесь альвеолярные макрофаги (АМ) первыми контактируют с инородными экзогенными частицами, выполняя защитную функцию. С помощью альвеолярных макрофагов идет первичная обработка ингалированных микрочастиц воздушной среды, изоляция за счет фагоцитирования, дальнейшая элиминация их из легкого системой транспорта и обезвреживание фагоцитированных веществ [2]. Подвергшиеся воздействию твердых взвешенных частиц АМ могут фагоцитировать их *ex vivo* и *in vitro* [77, 136]. В исследованиях *in vitro* выявлено, что макрофаги могут определять форму и размер целевых патогенов [88], вследствие чего ответ на разную размерность частиц может различаться. В связи с тем, что у частиц небиологического происхождения специфические опсонины отсутствуют, невозможно классическое опсонин-зависимое фагоцитирование [101, 129]. Рецептор макрофага с коллагеновой структурой (MARCO) и фагоцитарный рецептор класса А (SR-A) являются основными для опсонин-независимого фагоцитоза микрочастиц АМ [149, 162]. Функциональная недостаточность фагоцитарного рецептора может привести к снижению поглощения ТВЧ альвеолярными макрофагами. Однако твердые частицы воздушной среды могут включать в себя незначительное количество микробных материалов грамотрицательных бактерий (липополисахариды (эндотоксин)) [111], грибковые споры, зимозан и пептидогликан грамположительных бактерий [83], индуцирующие опсонин-зависимый фагоцитоз.

Toll-like рецепторы (TLRs), при взаимодействии с твердыми взвешенными частицами, активируют врожденный иммунитет [111],

поддерживают и регулируют адаптивный иммунный ответ. TLR2 и TLR4 являются главными связывающими микрочастицы TLRs, обнаруженными у людей [68]. В дополнение к этому, прикрепленные к поверхности твердых взвешенных частиц микроорганизмы могут быть адсорбированы специфическими опсонинами (компонент системы комплемента C3 и Fc-рецепторы иммуноглобулина) [99]. Альвеолярные макрофаги играют важнейшую роль в системе местного иммунитета органов дыхания, поскольку являются непосредственными участниками реакций специфического и неспецифического иммунного ответа, регулируя совместное функционирование клеток, участвующих в системе защиты. Макрофаги активно вырабатывают провоспалительные медиаторы, что способствует местной воспалительной реакции в легких и развитию системной воспалительной реакции. При контакте с загрязняющими частицами альвеолярные макрофаги активируются, вырабатывают провоспалительные цитокины и подвергаются апоптозу. Способность индуцировать апоптоз и воспаление изменяется при различных размерах и концентрации частиц. Исследования *in vitro*, сравнивающие влияние грубой и тонкой фракции PM_{10} , показали более сильные провоспалительные эффекты крупных частиц. В тоже время, альвеолярные макрофаги при воздействии меньших по размеру ТВЧ способных проникать глубоко в легкие, в большей степени способствуют системной воспалительной реакции. Системное воспаление характеризуется мобилизацией клеток воспаления из костного мозга в кровеносную систему, с последующей их активацией, а также производством белков острой фазы в печени и увеличением циркулирующих медиаторов воспаления. Это подтверждается в исследованиях, показавших, что $PM_{2,5}$ и ультратонкие частицы имеют самую сильную связь с неблагоприятными побочными действиями на сердечно-сосудистую систему [76, 159], что является прямым следствием системной реакции, вызванной этими частицами.

Образование активных форм кислорода (АФК) в результате токсического действия нано- и микрочастиц атмосферного воздуха, обусловленного, как самими компонентами ТВЧ, так и ответной реакцией системы местной защиты

легких, является одним из основных пусковых механизмов такого воздействия. Помимо местного раздражающего действия взвешенных веществ, осевших на слизистую оболочку, микрочастицы способны индуцировать развитие окислительного стресса в клетках дыхательных путей [72, 106]. В работах зарубежных и отечественных авторов доказана важная роль окислительного стресса в патогенезе самых различных респираторных заболеваний, включая хроническую обструктивную болезнь легких, бронхиальную астму, острые респираторные инфекции, рак легких [70, 74, 95, 140]. Окислительный стресс способствует возникновению и развитию воспалительных процессов не только в тканях и органах дыхательной, но и сердечно-сосудистой, и других систем, а также приводит к эпигенетическим изменениям в клетках [154]. По данным некоторых исследователей характер развития и интенсивность окислительного стресса во многом определяется физическими и химическими характеристиками взвешенных частиц [53, 123, 150]. Развитие окислительно-восстановительного дисбаланса в ответ на воздействие повреждающих факторов окружающей среды приводит к изменениям структуры макромолекул ДНК, липидов, белков, сбоям в работе систем редокс-сигналикации, что может приводить к развитию апоптоза и/или некроза клеток. Избыточное накопление АФК может вызвать не только повреждение клеточных структур, но и гибель самой клетки, и в организме существует система антиоксидантной защиты, поддерживающая окислительно-восстановительный баланс на физиологическом уровне. В то же время способность клетки противостоять патогенному воздействию микроразмерных поллютантов во многом зависит от адекватности репаративных механизмов, регулирующих факторы стрессоустойчивости клеток [43, 106, 113].

Наиболее значимую регуляторную функцию в поддержании окислительно-восстановительного клеточного баланса выполняет тиол-дисульфидное звено антиоксидантной системы. Проходящие в клетке окислительно-восстановительные реакции влияют на соотношение тиольных групп к дисульфидным составляющим, причем за восстановленное состояние

отвечают тиолы, а окисленным являются дисульфиды. Вне клетки белки содержат, в основном, дисульфидные связи, т.е. являются окисленными, а во внутриклеточных белках большинство цистеинов находятся в восстановленном состоянии. Редокс-опосредованные структурные и функциональные тиоловые модификации являются значимыми антиокислительными молекулярными механизмами [62]. Выделяют глутатионовую и тиоредоксиновую тиол-дисульфид-зависимые антиоксидантные системы (АОС).

Основными участниками глутатионового звена антиоксидантной системы являются глутатион, НАДФ-зависимая глутатион-редуктаза и глутаредоксины. Глутатион (гамма-L-глутамил-L-цистеинилглицин) по своей структуре является трипептидом в окисленной или восстановленной форме [62]. Внутри клетки глутатион, в основном, находится в восстановленной форме. Около 85–90% восстановленного глутатиона содержится в цитозоле, однако после синтеза в цитозоле незначительное количество обнаруживается в эндоплазматическом ретикулуме, ядре, митохондриях и пероксисомах. Доля глутатиона в окисленной форме внутри клетки составляет не более 1% от всего содержания [18]. Восстановление окисленной формы глутатиона проходит под непосредственным контролем глутатионредуктазы или с помощью тиоредоксина [62].

Внутриклеточная концентрация глутатиона довольно высока и составляет от 1 до 10 мМ. Это обеспечивает количественное преимущество глутатиона, как антиоксиданта. Гомеостаз внутри клетки восстановленной формы глутатиона регулируется как его непосредственным синтезом, так и другими процессами (клеточный экспорт, рециркуляция, утилизация). Таким образом, пара восстановленный/окисленный глутатион является окислительно-восстановительным буфером системы глутатиона, благодаря чему внутриклеточная среда остается в восстановленном состоянии. Этот окислительно-восстановительный цикл включает в себя и другие значимые антиоксиданты, ассоциированные с редокс-ферментами [62]. В модуляции, регуляции и поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза, путем

поддержания уровня глутатиона в восстановленной форме, участвует глутатион-редуктаза [75]. На значительное количество клеточных процессов влияет смещение глутатионового баланса в сторону окисленной формы глутатиона. Глутатион в клетке обратимо связывается с сигнальными, структурными, рецепторными, регуляторными, канальными белками и факторами транскрипции, принимающими участие в поддержании клеточного и тканевого гомеостаза [86]. Глутатион индуцирует ряд сигнальных путей, в том числе связанных с транскрипционным фактором NF-κB, протеинкиназами B, митоген-активируемыми протеинкиназами (MAPK) и апоптоз-сигнальной киназой 1 (Apoptosis-regulating Kinase 1 – ASK-1), понижая пролиферацию клеток и повышая риск апоптических изменений [18].

Глутатион напрямую нейтрализует активные формы кислорода и подавляет пероксидацию липидов. Посредством взаимодействия с различными глутатион-пероксидазами глутатион принимает участие в детоксикации перекиси водорода, осуществляя защиту митохондриальных и клеточных мембран от оксидативного стресса. Путем активации глутатионового звена АОС, разрывается цепная реакция липидного окисления, что дает возможность сдерживать лавинообразное накопление пероксидных продуктов. Восстановление гидроперекисей мембранных фосфолипидов проходит с участием глутатионпероксидаз и глутатион-S-трансфераз. При воздействии твердых взвешенных частиц воздушной среды глутатионпероксидаза и глутатион выполняют важную функцию поддержания уровня митохондриального мембранного потенциала, обеспечивая нормальное энергетическое состояние клеток [106]. Восстанавливая ряд экзогенных антиоксидантов, глутатион переводит их в активную форму [62]. Выявлено, что глутатион-пероксидаза и глутатион влияют на функции значительного числа белков за счет их S-глутатионилирования с дальнейшим восстановлением глутаредоксинами. Структурные и функциональные изменения редокс-чувствительных белков обеспечивается за счет регулируемой посттрансляционной модификацией (глутатионилирование), когда цистеин

конъюгируется с восстановленным глутатионом [127]. Показано, что глутатионилирование может происходить и в физиологических условиях, и при оксидативном стрессе, следует заметить, что степень глутатионилирования зависит от соотношения восстановленная/окисленная форма глутатиона в клетке. По современным данным, более высокая концентрация окисленного глутатиона повышает уровень связывания глутатиона [86]. Следовательно, глутатион, являясь редокс-буфером, регулирует функциональную активность белков следующими способами: посредством косвенного изменения окислительно-восстановительного состояния и белкового заряда (без связывания с белком) и за счет прямого связывания с белками с образованием дисульфидных связей (глутатионилирования) [86].

Другая тиол-дисульфидзависимая система антиоксидантной защиты – тиоредоксиновая, занимает важное место в осуществлении репарации структур клеток. Она включает в себя тиоредоксин, тиоредоксинпероксидазу/пероксиредоксин и никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат(НАДФ)-зависимую тиоредоксинредуктазу [117]. Помимо этого, в состав тиоредоксиновой системы также входит тиоредоксин-взаимодействующий белок (TXNIP), подавляющий активность тиоредоксина путем формирования между их активными центрами дисульфидной связи. В результате экспрессии тиоредоксин-взаимодействующего белка клетки проявляют чувствительность к оксидативному стрессу, что ведет к развитию апоптоза. Семейство тиоредоксина включает митохондриальный тиоредоксин, цитозольный тиоредоксин и изоформу, специфичную для сперматиды [119]. Несмотря на то, что у цитозольной формы тиоредоксина отсутствуют последовательности, ассоциированные с локализацией в ядре клетки, наблюдалось его наличие в ядрах некоторых клеток [103]. Ферменты тиоредоксинового звена могут секретироваться во внеклеточное окружение или быть связанными с мембранами клеток [115, 164]. Тиоредоксин в окисленной форме преобразуется в активную восстановленную форму за счет приема электронов от НАДФН с участием тиоредоксинредуктазы. Восстановленный тиоредоксин путем переноса

электронов из тиольных реакционноспособных фрагментов редуцирует целевые белки с дисульфидными связями [119]. Реакция глутатионилирования цитозольной формы тиоредоксина предотвращает его димеризацию, индуцируемую окислительным стрессом [119]. По современным представлениям тиоредоксинпероксидаза (пероксиредоксин) регулирует окислительно-восстановительный статус тиоредоксина и выступает в качестве важного медиатора сигналинга окислительно-восстановительных процессов. Множественные окислительные состояния цитозольной формы тиоредоксина вносят определенный вклад в тонкую настройку окислительно-восстановительной модуляции сигнальных белков (транскрипционного фактора Ref-1, фосфатазы PTEN, киназы ASK-1) [120].

Дисульфид-редуктазная функция является основной для тиоредоксиновой системы. Она обеспечивает формирование правильной третичной структуры белков за счет восстановления дисульфидных связей. Развитие окислительного стресса сопровождается деструкцией белковых структур клеточных компартментов. Степень окислительного повреждения белков в значительной мере зависит от функциональной активности тиоредоксиновой антиоксидантной защиты, осуществляемой посредством блокирования образования пероксидов липидов, соединяющихся с аминокислотными остатками, а также за счет восстановления дисульфидных связей [106]. Установлено, что тиоредоксиновые ферменты распознают окисленную форму целевых белков с более высокой степенью селективности, чем их восстановленные формы [128].

Тиоредоксиновая система принимает участие в репарации белков и косвенно – посредством восстановления метионин-сульфоксид редуктазы, осуществляющей восстановление окисленного метионина. Наряду с этим, тиоредоксиновое звено антиоксидантной защиты восстанавливает ферменты, играющие ключевую роль для функционирования ДНК: обеспечивая синтез за счет рибонуклеотидредуктазы [117], осуществляя защиту геномного материала путем поддержания редокс-потенциала клеток, участвуя в репарации

возникших повреждений и передаче сигнала остальным участникам АОЗ [106] (рисунок 1).

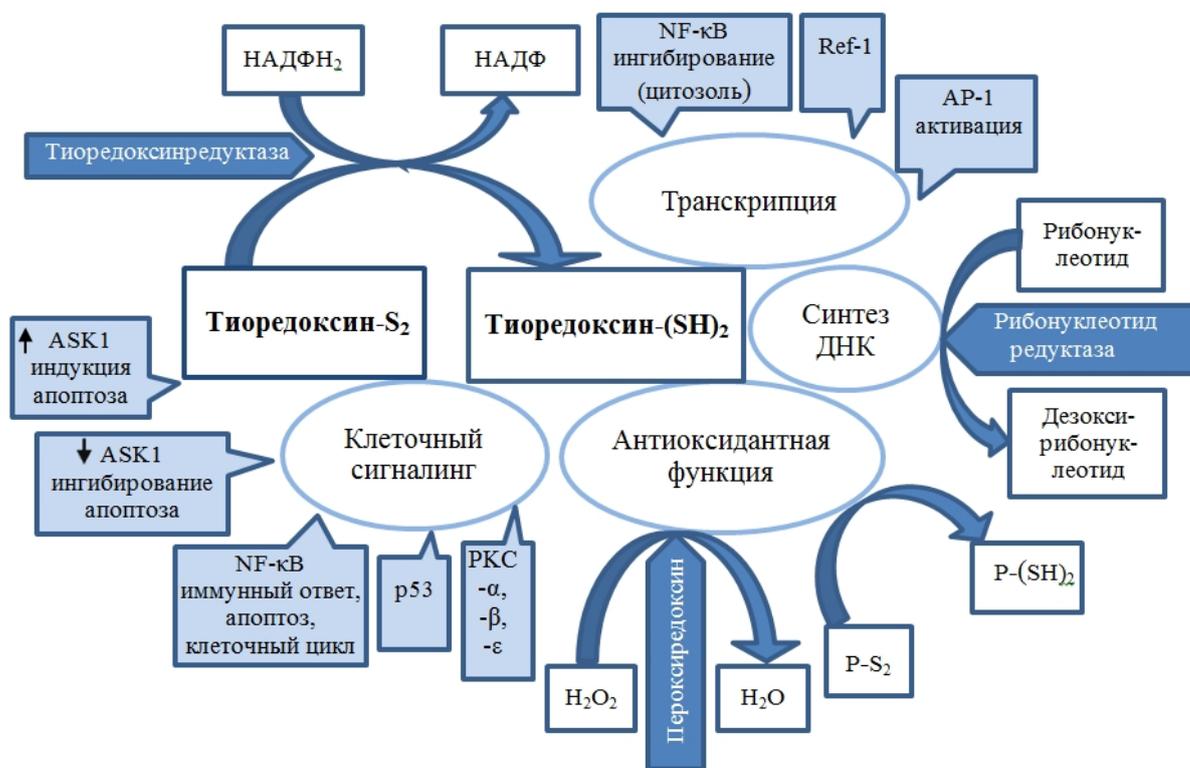


Рисунок 1 – Физиологические функции тиоредоксина в клетке [5].

Примечание: Тиоредоксин-S₂ – тиоредоксин в окисленной форме, Тиоредоксин-(SH)₂ – тиоредоксин в восстановленной форме, НАДФ – никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат в окисленной форме, НАДФН₂ – никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат в восстановленной форме, P-S₂ – белок в окисленной форме, P-(SH)₂ – белок в восстановленной форме, ASK-1 – (Apoptosis-Regulating Kinase-1) киназа-1, передающая сигнал апоптоза, p53 – белок p53, транскрипционный фактор, регулирует клеточный цикл, РКС – (Protein Kinase C) протеинкиназа C, NF-κB – (Nuclear Factor kappaB) ядерный транскрипционный фактор κB, Ref-1 – (Redox-Factor-1) транскрипционный фактор, AP-1 – (Activating Protein-1) белок активатор-1, транскрипционный фактор.

Нейтрализация активных форм кислорода является одной из важных составляющих функционирования тиоредоксинового звена антиоксидантной системы за счет предоставления электронов пероксиредоксинам, запускающие процесс с очень высокой скоростью реакции. Самостоятельно тиоредоксин реагирует с H₂O₂ медленно, поэтому пероксиредоксин катализирует окисление гидропероксидами и может повлиять на редокс-регулирование, поддерживая

тиоредоксиновый окислительно-восстановительный статус. В то же время может быть осуществлена иная модель, когда окислительно-восстановительный путь между сигнальным белком и H_2O_2 будет реализован не только за счет пероксиредоксина, но и тиоредоксина. В соответствии с этим сигнальным путем тиоредоксинпероксидаза – тиоредоксин, окислительный эквивалент от H_2O_2 переносится в пероксиредоксин (тиоредоксинпероксидазу), а затем в тиоредоксин и, наконец, в сигнальный белок. В то же время, пероксиредоксин может осуществлять окисление тиоредоксина, избегая тем самым взаимодействия сигнального белка с тиолдисульфидной оксидоредуктазой. Для этой модели взаимодействие тиоредоксинпероксидаза – тиоредоксин характерно в условиях, когда высокие уровни H_2O_2 воздействуют на клетки, провоцируя гиперокисление пероксиредоксина [120].

Тиоредоксин осуществляет надзор за активностью и функционированием сигнальных белков. Показано, что именно окисленная форма тиоредоксина активирует определенные пути передачи сигнала. Только низкие уровни цитозольной и митохондриальной форм тиоредоксина связывают апоптоз-сигнальную киназу 1, тем самым ингибируя ее активность. Оксидативный стресс ведет к диссоциации комплекса ASK-1–цитозольный тиоредоксин, обуславливая активацию Apoptosis-Regulating Kinase-1, запускающей апоптотический сигнальный каскад [120]. Следующим примером редокс-регулируемого является индукция фактора транскрипции NF- κ B, регулирующего иммунный ответ, клеточный цикл и апоптоз, цитозольной формой тиоредоксина. Для связывания транскрипционного фактора NF- κ B с ДНК необходимо восстановление у цитозольной формы тиоредоксина только одного остатка цистеина [120].

Представленные выше данные исследований убедительно продемонстрировали, что функционирование глутатионовой и тиоредоксиновой АОС нацелено на репарацию макромолекул клеток, поддержание физиологического уровня редокс-баланса, причем системы способны к взаимному подстраховыванию и согласованной работе [117] (рисунк 2).

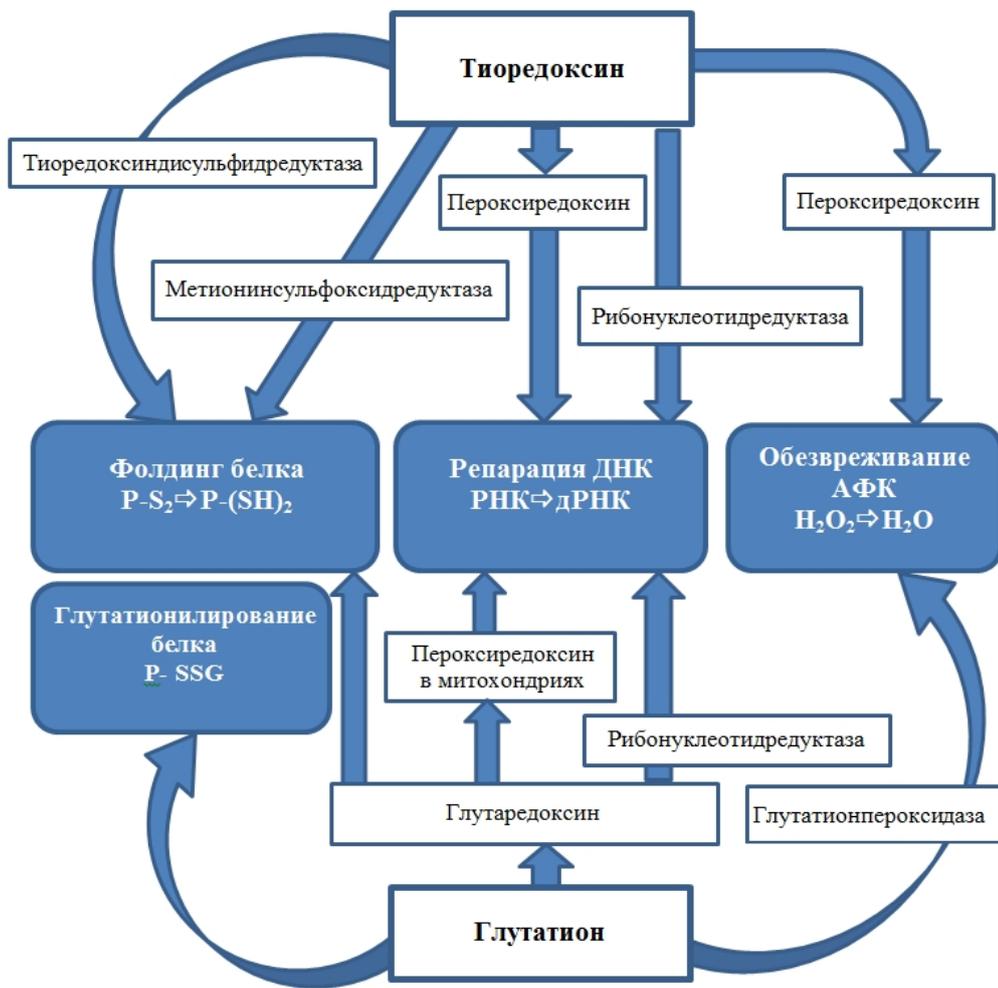


Рисунок 2 – Взаимодействие глутатионовой и тиоредоксиновой систем [5].

Примечание: P-S₂ – белок в окисленной форме, P-(SH)₂ – белок в восстановленной форме, P-SSG – белок в глутатионилированной форме, ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота, РНК – рибонуклеиновая кислота, дРНК – ядерная ДНК-подобная рибонуклеиновая кислота, АФК – активные формы кислорода.

Изучение регуляторной функции глутатионовой и тиоредоксиновой систем антиоксидантной защиты клетки является актуальным направлением исследований механизмов развития оксидативного стресса, вызываемого воздействием твердых взвешенных частиц воздушной среды. Понимание механизмов развития окислительного стресса и антиоксидантной защиты от неблагоприятных факторов внешней среды может стать основой для разработки методов ранней диагностики, выявления терапевтических целей для

профилактического лечения восприимчивых групп и выработки стратегий лечения экологозависимых заболеваний [53, 63, 119].

Таким образом, изучение воздействия модельных взвесей, характеризующих реальное содержание ТВЧ в приземном слое атмосферного воздуха урбанизированной территории, позволит оценить нарушения окислительно-восстановительных процессов в культуре АМ крыс линии Вистар. Ответная реакция клеточных структур и установление особенностей формирования окислительного стресса, индуцированного ТВЧ, даст возможность выделить индикаторы окислительного повреждения альвеолярных макрофагов при воздействии микрочастиц атмосферного воздуха.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Методы оценки загрязнения атмосферного воздуха взвешенными в приземном слое твердыми микрочастицами

Оценку *фракционного состава* микроразмерных ТВЧ в приземном слое атмосферного воздуха двух различных по уровню техногенного прессинга урбанизированных территорий г. Владивостока провели за период 2013–2016 гг. Основными критериями выбора обследуемой территории служили такие характеристики, как наличие или отсутствие крупных промышленных предприятий, ТЭЦ, крупных автотранспортных развязок и магистралей, крупных лесопарковых зон и берега моря.

В качестве района с незначительной техногенной нагрузкой выбрали остров Русский. Для данного административного района города Владивостока характерно отсутствие заводов и крупных предприятий, незначительная плотность селитебной застройки. Основными источниками загрязнения атмосферного воздуха являются грунтовые дороги с незначительной интенсивностью автомобильного движения (до 60 авт./час), в отопительный сезон (последняя декада октября – первая декада мая) дополнительными источниками являются котельные и печные отопительные системы частного сектора. Особенность физико-географической характеристики острова Русский – это наличие обширной морской акватории (б. Новик) и значительных лесных массивов.

В качестве района с высокой техногенной нагрузкой выбрали материковую часть города Владивосток – район Вторая речка с высокой плотностью селитебной застройки. В этом районе загрязнение атмосферного воздуха связано с нахождением мусоросжигательного завода, ТЦ «Северная», асфальтированной дороги с высоким автомобильным трафиком (2400–3000 авт./час). Круглогодично весомый вклад в загрязнение атмосферного воздуха

вносят автомобильный транспорт и мусоросжигательный завод (500 м от места отбора проб). Теплоцентраль «Северная» обеспечивает только выработку теплоносителя, в период отсутствия отопления (май – октябрь) не работает.

Отобрали и проанализировали 68 проб приземного слоя атмосферного воздуха: 30 проб отобрали в районе с незначительным техногенным прессингом, 38 проб – в районе с высоким уровнем техногенного прессинга (рисунок 3).

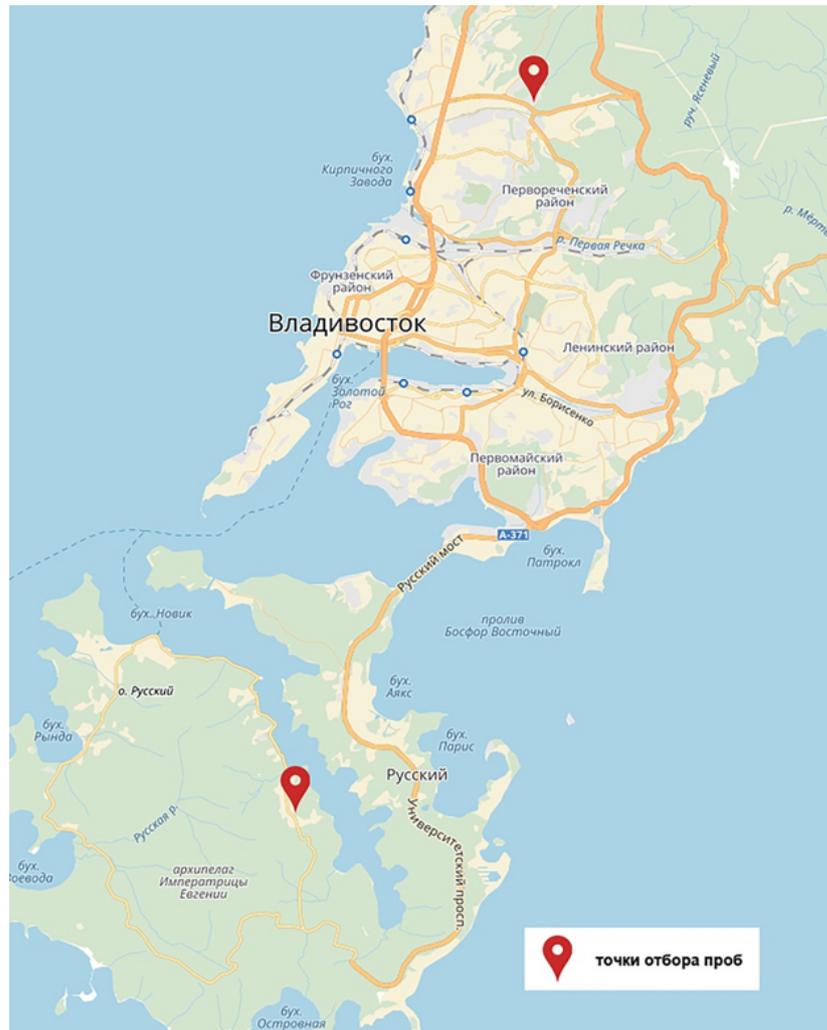


Рисунок 3 – Точки отбора проб атмосферного воздуха.

Отбор проб воздуха проводили по авторской методике [3, 14]. Метод позволяет определить уровень загрязнения и гранулометрическое распределение ТВЧ в приземном слое атмосферного воздуха, являющемся «зоной дыхания» и непосредственно воздействующем на органы дыхания. Для

определения удельного веса фракций и приземной концентрации мелкодисперсных ТВЧ отбор пробы проводили на высоте 1,5 м от поверхности земли. Маршрутный пост размещали в фиксированной точке местности. Пробы атмосферного воздуха отбирали с помощью электрического аспиратора ПУ-4Э (ЗАО «ХИМКО», Россия) в жидкую поглотительную среду (высокоочищенная вода) с использованием высокоскоростного поглотителя Рихтера со скоростью 10 л/мин. Поглотитель Рихтера № 1 содержал жидкую среду для сбора твердых взвешенных частиц. Поглотитель Рихтера № 2 (пустой), расположенный между поглотителем и штуцером «вход» соответствующего канала, использовали для предотвращения попадания жидкого поглотителя в аспиратор. Параллельно со скоростью 35 л/мин проводили отбор пробы на фильтр (АФА-ВП-20) (рисунок 4).

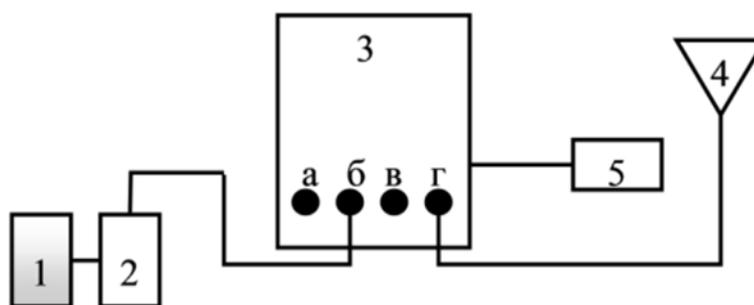


Рисунок 4 – Схема установки для отбора проб атмосферного воздуха [3].

Примечание: 1 – поглотитель Рихтера № 1, содержащий высокоочищенную воду, 2 – поглотитель Рихтера № 2 (пустой), 3 – аспиратор ПУ-4Э: б – 2 канал с расходом воздуха 10 дм³/мин (для определения гранулометрического распределения ТВЧ), г – 4 канал с расходом воздуха 35 дм³/мин (для определения общей массы микрочастиц), 4 – держатель для опорной сетки с фильтром (АФА-ВП-20), 5 – источник питания.

Усредненный результат отбора шести последовательных циклов по 30 мин (время одного цикла соответствует времени отбора для расчета максимальной разовой ПДК) с перерывом между циклами 5–10 мин формировал одну пробу атмосферного воздуха. В начале каждого цикла фиксировали метеорологические данные: направление и скорость ветра, температуру окружающего воздуха, атмосферное давление на уровне моря и станции, погодные условия и состояние подстилающей поверхности почвы.

Распределение частиц по размерам, выраженное в массовых долях, устанавливали при помощи лазерного анализатора размера частиц Analysette 22 NanoTech (Fritsch, Германия). Фильтры взвешивали на электронных весах Shimadzu (Япония), рассчитывали общую массовую концентрацию взвешенных веществ в единице объема атмосферного воздуха ($\text{мг}/\text{м}^3$), затем массовую концентрацию фракций ($\text{мкг}/\text{м}^3$) в каждой пробе [17].

Качественный состав взвешенных в атмосферном воздухе г. Владивостока микрочастиц описан в работах исследователей [10, 13, 15], проводивших оценку загрязнения различных районов г. Владивостока по осадочным пробам. В районах с высокой антропогенной нагрузкой были обнаружены частицы сажи, шлака, асфальтового покрытия, резины, оксиды железа, синтетические волокна, а также частицы природного происхождения – кварца, полевого шпата, органика. Помимо промышленных выбросов в атмосферный воздух города Владивостока поступает дым и зола различных котельных, работающих на твердом топливе, и мусоросжигательного завода [11, 29]. В основном, выбросы промышленных предприятий производятся на высоте до 50 м. Около 51% от всего загрязнения атмосферы города Владивостока составляют выбросы автотранспорта [15].

В типичных прибрежных районах с незначительной техногенной нагрузкой были выявлены частицы плагиоклазы, каолинита, кварца, полевого шпата, животный и растительный детрит, кремнисто-железо-оксидные частицы, частицы угля, шлаковые спеки, частицы синтетики и резины, частицы бетона, стекловатые частицы и частицы неустановленного техногенного происхождения [10, 34]. Многие частицы были в агрегированном состоянии. Однако в основном, на состав атмосферных взвесей типичных прибрежных районов (значительную часть составляют галит, силикаты, органический детрит, пыльца) влияет берег моря и лес [10, 15, 29].

Сопоставив полученные данные фракционного состава ТВЧ двух различающихся по техногенной нагрузке районов с литературными данными качественного состава атмосферных взвесей типичных районов [10–13, 47],

были разработаны модельные взвеси, характеризующие реальное поликомпонентное загрязнение взвешенными частицами приземного слоя атмосферного воздуха конкретной территории.

Для приготовления модельной взвеси ТВЧ обоих районов в качестве основных компонентов были взяты сажа и пепел, минералы, металлы, синтетические и органические вещества [10–13]. В качестве металлических микрочастиц были использованы микрочастицы оксидов железа и свинца. Приморские месторождения цеолитового туфа (смесь цеолита, кварца, полевого шпата, плагиоклаза, каолинита) – в качестве минералов. Пепел был представлен аморфным крупнодисперсным углеродом, а сажа – нано- и мелкодисперсными частицами углерода. Основное различие составило процентное соотношение основных компонентов в каждой размерной фракции.

Каждый компонент модельной взвеси был измельчен до необходимой размерности, после чего модельные взвеси, характеризующие районы с различной техногенной нагрузкой, были смешаны в необходимой пропорции [40]. Состав модельных взвесей, использованных для нагрузки культуры клеток макрофагов БАЛ, приведен в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – Содержание компонентов модельной взвеси № 1, характеризующей загрязнение атмосферного воздуха территории с незначительной техногенной нагрузкой (%)

Диапазон размеров ТВЧ, мкм	0-0,1	0,1-1	1-2,5	2,5-10	10-100	100-1000	Итого, %
сажа и пепел	0	1,6	3,3	5,1			10
минералы				12,2	57,5	0,3	70
металлические частицы					10		10
органический детрит					5		5
синтетические частицы (пластмассы, волокна)					5		5
Итого, %	0	1,6	3,3	17,3	77,5	0,3	100

Таблица 2 – Содержание компонентов модельной взвеси № 2, характеризующей загрязнение атмосферного воздуха территории с высокой техногенной нагрузкой (%)

Диапазон размеров ТВЧ, мкм	0-0,1	0,1-1	1-2,5	2,5-10	10-100	100-1000	Итого, %
сажа и пепел	8,1	19,7	6,3	5,9			40
минералы				20,4	19,6		40
металлические частицы				10			10
органический детрит					5		5
синтетические частицы (пластмассы, волокна)					5		5
Итого, %	8,1	19,7	6,3	36,3	29,6	0	100

Для получения модельных взвесей компоненты измельчали в планетарной мельнице (Fritsch Pulverisette 2, Германия) в размольном стакане объемом 250 мл с шариками из карбида вольфрама в течение 10 мин, со скоростью главного диска 400 об/мин и сателлитов 800 об/мин [24, 26, 40]. После завершения приготовления модельной взвеси провели фракционный анализ ТВЧ с помощью лазерного анализатора размера частиц Analysette 22 NanoTech (Fritsch, Германия) на предмет соответствия заявленным гранулометрическим параметрам (рисунок 5).

В модельной взвеси № 1 основную долю составили частицы $PM_{>10}$ (78% от содержания всех частиц), принадлежащие к экстраторакальной и трахеобронхиальной фракциям. Содержание частиц PM_1 и $PM_{1-2,5}$, представляющих наибольшую угрозу для клеток, составило около 5%.

Модельная взвесь № 2, наоборот, характеризовалась преобладанием мелкодисперсных частиц (70,4% от содержания всех частиц). Наиболее мелкие частицы имели размер порядка 0,01 мкм (10 нм), что чуть больше толщины плазмалеммы. Частицы в диапазоне фракции до 1 мкм составили 28%, 1–2,5 мкм – 6,3%, от 2,5 до 10 мкм – 36%. Крупных частиц было немного, их размер не превышал 47,0 мкм.

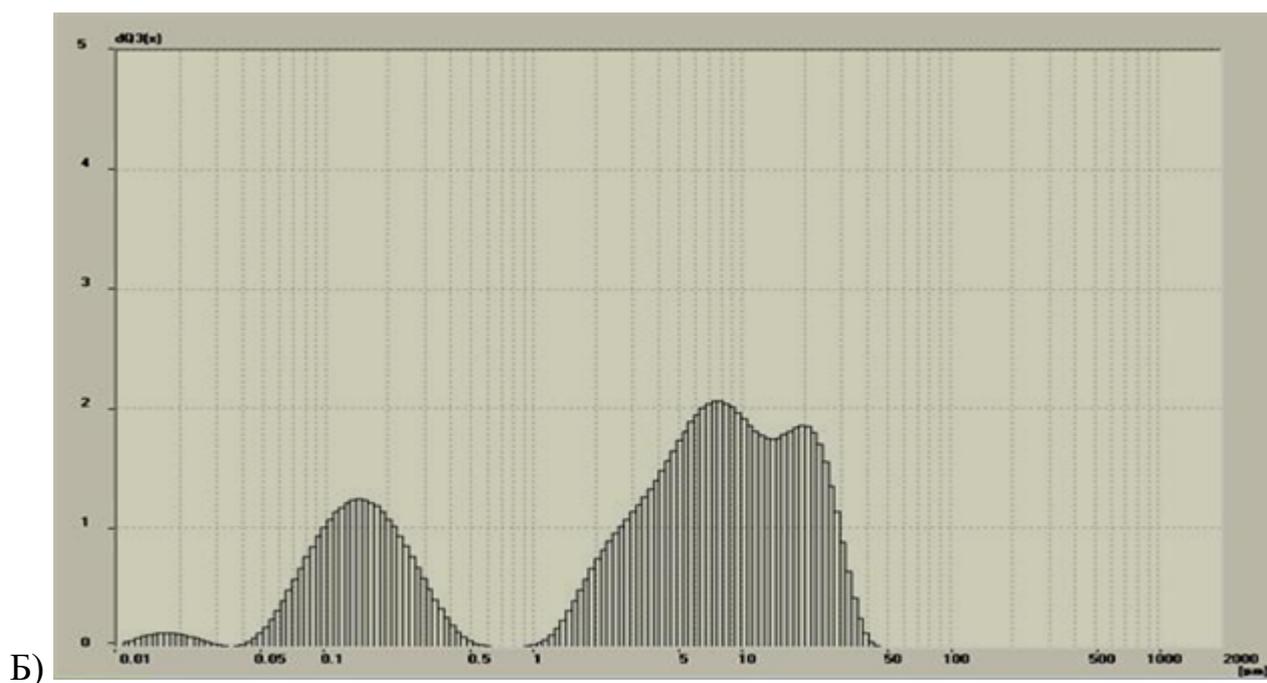
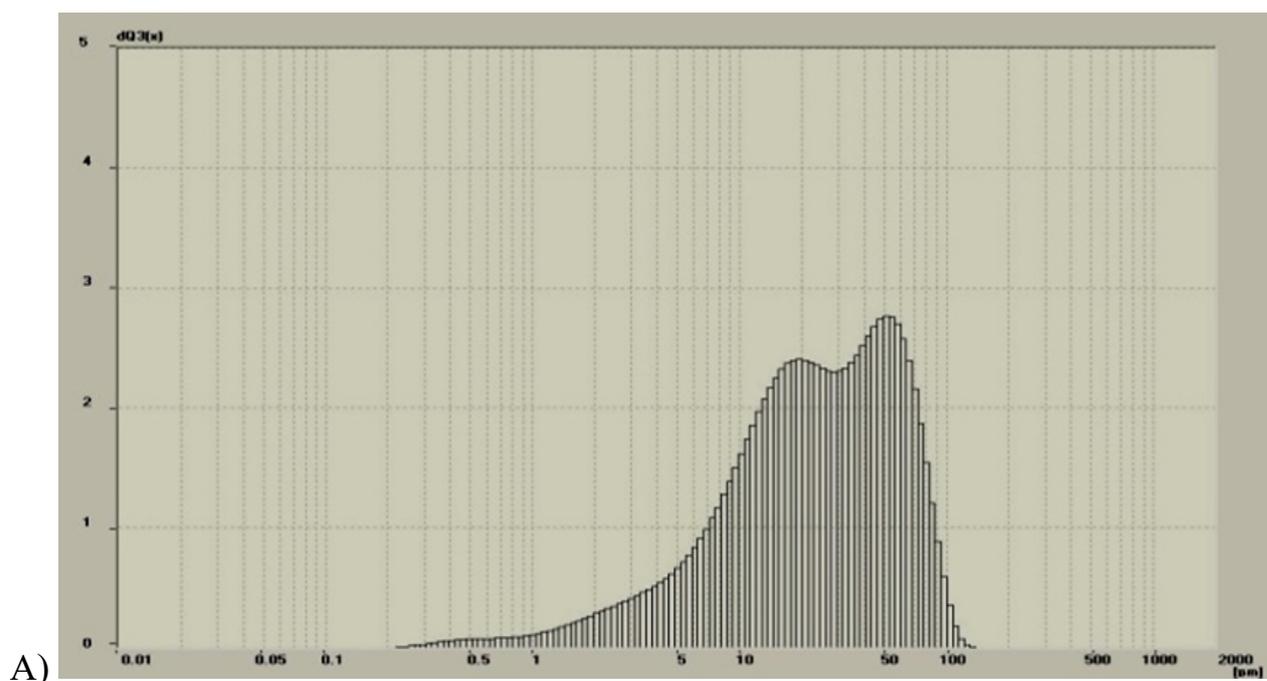


Рисунок 5 – Профили частиц модельных взвесей, соответствующих составу ТВЧ атмосферного воздуха территории с незначительным (А – модельная взвесь № 1) и высоким (Б – модельная взвесь № 2) техногенным прессингом.

Примечание: на оси абсцисс – диаметр частиц (в мкм), на оси ординат – распределение по частоте (в %).

2.2. Методы экспериментальных исследований (*in vitro*)

2.2.1. Получение культуры альвеолярных макрофагов

Экспериментальное исследование проводили в соответствии с биоэтическими принципами и стандартами содержания и эвтаназии животных, Международными стандартами по лабораторной практике и действующими нормативными документами законодательства Российской Федерации. [36, 37, 93, 109]. С целью изучения биологических механизмов действия факторов окружающей среды (в нашем исследовании – это микроразмерные ТВЧ атмосферного воздуха) в условиях *in vitro* использовали бронхоальвеолярный лаваж [7]. После завершения отбора бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) удаление животных из эксперимента осуществляли с помощью декапитации при соблюдении требований гуманности в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных [37]. Протокол экспериментального исследования утвержден комитетом по биомедицинской этике Владивостокского филиала ДНЦ ФПД – НИМКВЛ.

В экспериментальном исследовании использовали 17 самцов белых крыс линии Вистар 6-ти месячного возраста и массой 180–240 грамм, у которых осуществляли отбор БАЛ с последующим выделением и культивированием макрофагов. При получении БАЛ использовали метод С.С. Целуйко с соавторами [45] в модификации. Животных усыпляли введением соответствующего препарата внутримышечно, так как из-за возможного повреждения слизистой оболочки недопустимо применение препаратов, поступающих непосредственно в респираторный тракт (эфира, хлороформа и др.). До вскрытия провели обработку операционного поля животных 70% спиртовым раствором. Кожные покровы рассекали скальпелем, затем вдоль грудины вскрывали грудную клетку. Трахею при помощи ножниц отделяли от подлежащих тканей и, придерживая её зажимом, перерезали, потом вводили

канюлю. Для получения лаважной жидкости использовали среду DMEM с телячьей сывороткой, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2,5 мкг/мл фунгизона. До процедуры отбора среду DMEM подогрели до 37 °С, промывание пространства дыхательных путей и альвеол проводили дробно, в среднем на каждое животное, в зависимости от его размера и массы, использовали 15 мл. При помощи шприца каждую порцию 5–7 раз медленно пропускали через трахею, вместе с этим проводили массаж области за грудиной (рисунок 6). Полученную лаважную жидкость от каждого животного собирали в отдельную стерильную пробирку и хранили на льду до дальнейших манипуляций [24].



Рисунок 6 – Получение бронхоальвеолярной лаважной жидкости.

Для выделения альвеолярных макрофагов из полученной бронхоальвеолярной лаважной жидкости, пробирки центрифугировали с охлаждением до +4 °С при 500g в течение 10 мин. Супернатант сливали, осадок разводили 1 мл среды DMEM с телячьей сывороткой и в дальнейшем полученную клеточную суспензию (альвеолярные макрофаги, эритроциты, лимфоциты, нейтрофилы) использовали для получения макрофагов [24]. В пробирку на 15 мл добавляли 2 мл перколлы (плотность 1,078 г/мл), на который осторожно наслаивали клеточную суспензию. Пробы центрифугировали при 453g в течение 20 мин (без разгона и торможения) при комнатной температуре.

Затем из взвеси клеток выделяли альвеолярные макрофаги, для этого кольцо с макрофагами на границе раздела фаз аккуратно отбирали в пробирки на 15 мл, добавляли 1 мл среды. Полученные пробы центрифугировали при охлаждении (+4 °C) со скоростью 453g в течение 10 мин. Супернатанты сливали к осадку, содержащему макрофаги, добавляли 1 мл среды культивирования. В камере Горяева подсчитывали количество клеток, извлеченных из легких. Оценивали первичное состояние полученных культур. В зависимости от количества клеток доводили концентрацию клеток до 100 000 клеток в 1 мл, добавляя среду для культивирования.

2.2.2. Культивирование альвеолярных макрофагов и нагрузка модельными взвесями твердых микрочастиц

Полученные культуры альвеолярных макрофагов от каждого животного разделили на 3 группы и поместили в лунки 12-ти луночных планшетов. Культивирование проводили в среде DMEM, содержащей телячью сыворотку, антибиотики (пенициллин в дозе 50 ед/мл и стрептомицин в дозе 50 мкг/мл) и антимикотик (фунгизон в дозе 2,5 мкг/мл), при температуре +37 °C и 5%-ном содержании углекислого газа в инкубаторе. Ежедневно меняли питательную среду: отбирали 500-1000 мкл среды и в таком же объеме вносили новую питательную среду. Культуры клеток анализировали в течение всего эксперимента, используя инвертированный световой микроскоп Axio Observer A1 (Carl Zeiss, Германия) [24].

Нагрузку альвеолярных макрофагов проводили на третий день от начала культивирования [23]. Культуру 1-ой группы клеток оставляли без нагрузки, в лунки 2-ой группы альвеолярных макрофагов добавляли суспензию модельной взвеси № 1 (соответствует району с низкой техногенной нагрузкой), в лунки третьей группы – суспензию модельной взвеси № 2 (соответствует району с

высокой техногенной нагрузкой). До проведения нагрузки полученные сухие навески дезинфицировали путем ультрафиолетового облучения, после этого 1 мкг соответствующей модельной взвеси диспергировали в 1 мл среды DMEM с телячьей сывороткой, подогретой до +37 °С. Полученные суспензии добавляли в лунки с клеточной культурой в дозе 1 мл суспензии на 1 лунку (100 000 клеток).

До и после нагрузки проводили оценку жизнеспособности клеток. Для исследования смешивали одинаковые объемы приготовленного на физиологическом растворе 0,2% раствора трипанового синего и суспензии клеток [35]. Клетки инкубировали при температуре +37 °С в течение 10 мин, затем подсчитывали в камере Горяева долю окрашенных (мертвых) клеток от общего числа всех клеточных элементов.

На третий день после добавления модельных взвесей ТВЧ проводили отбор проб. Для этого перемешивали содержимое всех лунок и отбирали культуральную среду в микропробирки на 1,5 мл с соответствующей маркировкой для определения биохимических показателей. Из опытных лунок пипеткой удаляли все крупные частички взвесей. Затем в каждую лунку добавляли 200 мкл 0,25% раствора трипсина, инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем добавляли 800 мкл среды DMEM с телячьей сывороткой, тщательно суспендировали и переносили в соответствующие микропробирки на 1,5 мл. Далее пробы центрифугировали 10 мин при комнатной температуре на миницентрифуге при 500g. Супернатант сливали, осадок разбавляли 500 мкл среды с сывороткой и антибиотиками. Часть биологического материала полученных культур клеток замораживали при температуре –80 °С для дальнейших исследований.

2.3. Лабораторные методы исследований

2.3.1. Оценка параметров процесса пероксидации

Определение уровня гидропероксидов липидов (ГПЛ, усл. ед.) проводили в гептан-изопропанольных экстрактах [8, 28]. Для культуральной жидкости в качестве контроля использовали среду культивирования (среда DMEM с телячьей сывороткой и антибиотиками). Исследования проводили в дублях. К 0,1 мл взвеси культуры клеток в среде (400 тысяч клеток/мл), культуральной жидкости и контролям стеклянной пипеткой приливали по 3 мл смеси н-гептан : изопропанол (2:1, об./об.). Интенсивно встряхивали в течение 15 мин. К полученной смеси добавляли 0,5 мл водного раствора соляной кислоты (рН2,0) и вновь интенсивно встряхивали. Пробы оставляли при комнатной температуре на 25 мин до полного расслоения фаз. Отбирали из гептанового слоя (верхняя фаза) каждой пробы 3 аликвоты объемом по 0,3 мл в лунки кварцевого планшета. Замеряли экстинкцию опытных и контрольных образцов на спектрофотометре BioTek (USA) при длине волны 233 нм. Контролем служила среда для смыва клеток, подвергнутая всем перечисленным этапам обработки.

Определение уровня малонового диальдегида (МДА, ммоль/л) проводили согласно инструкции к набору Malondialdehyde Assay Northwest Life Science Specialities, LLC (USA). Принцип метода состоит в реакции между малоновым диальдегидом и 2-тиобарбитуровой кислотой (колориметрический метод). Измеряли спектр излучения при длине волны 532 нм на спектрофотометре BioTek (USA). Анализ данных провели с помощью программного продукта.

Определение уровня протеин карбонила (ПК, нмоль/мг). Метод определения карбонилированных белков основан на дериватизации динитрофенилгидразином (ДНФГ) и выявлении связавшихся анти-ДНФГ антител с использованием набора Protein Carbonyl ELISA Northwest Life Science Specialities, LLC (USA).

Определение уровня 8-гидрокси-2'-деоксигуанозина (8-ОХДГ, нг/мл) проводили с помощью набора для иммуноферментного анализа NWLSSTM 8-ОХДГ ELISA (Northwest Life Science Specialties, LLC, USA). Полученные данные анализировали с помощью программного продукта.

2.3.2. Определение показателей системы антиоксидантной защиты

Определение уровня общей антиоксидантной активности (АОА, ммоль/л) проводили с помощью набора Total antioxidant assay, Total Antioxidant Status Control; Randox Laboratories Ltd., UK. Принцип метода состоит в реакции между 2,2'-азино-ди-[3-этилбензтиазолин-6-сульфоната] (АБТС), пероксидазой (метмиоглобин) и пероксидом водорода (колориметрический метод). Измеряли спектр излучения при длине волны 600 нм и +37 °С на спектрофотометре BioTek (USA).

Определение глутатиона (общего, окисленного и восстановленного) (мкмоль/л) проводили колориметрическим методом с помощью набора Arbor Assays' Glutathione Colorimetric Detection kit (ArborAssays, USA) согласно инструкции к набору. Показания оптической плотности определяли на спектрофотометре при длине волны 405 нм на спектрофотометре BioTek (USA). Полученные данные использовали для определения концентрации общего и окисленного глутатиона. Расчет показателей проводили с использованием программного продукта. Содержание свободного глутатиона вычисляли по разности содержания общего и окисленного глутатиона.

Уровень тиоредоксина (нг/мл) определяли методом иммуноферментного анализа с помощью набора Thioredoxin-1 ELISA (Northwest Life Science Specialties, LLC, USA). Полученные данные анализировали с помощью программного продукта «Curve Expert 1.3», составляя рекомендованный стандартный график.

2.4. Информационно-аналитические методы

Математико-статистическую обработку собранных в ходе исследования данных проводили с помощью программы «Statistica 8.0». Результаты непараметрической описательной статистики представлены в виде медианы (Me) и квантилей (Q_1 и Q_3). Непараметрический U-критерий Манна-Уитни использовали для сравнения полученных данных. При проверке статистических гипотез заданный критический уровень значимости принимали равным 0,05.

Статистическую обработку данных проводили с позиции изучения взаимосвязей, оценивающих роль каждого клеточного параметра в процессе взаимодействия клеток с твердыми взвешенными частицами. При расчете взаимодействий использовали программу «Statistica 8.0» с отбором парных корреляций r при $p < 0,05$. Парные корреляционные взаимосвязи между показателями ответной реакции альвеолярных макрофагов и характеристиками модельных взвесей ТВЧ рассчитаны с помощью коэффициента корреляции Спирмена. Для оценки внутрисистемной напряженности рассчитан показатель D_b (%), характеризующий интегральный отклик клеточных параметров на воздействие модельных взвесей ТВЧ. В расчет показателя D_b вводили корреляционные связи r , имеющие статистическую значимость результата ($p < 0,05$), фактическая величина которых суммировалась, а затем соотносилась к предполагаемой максимальной сумме корреляционных связей при $R=1,0$.

$$D_b = \sum r_i N R \times 100 ,$$

где: D_b – показатель внутрисистемной напряженности (в %); n – количество корреляционных связей ($p < 0,05$); r – величина фактической корреляционной связи ($p < 0,05$); N – максимальное число предполагаемых корреляционных ячеек в матрице; R – максимальная величина корреляционной связи, равная 1,0. Показатель D_b указывал на степень функционального напряжения системы «перекисное окисление–антиоксидантная защита» под воздействием модельных взвесей.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Оценка фракционного состава твердых микрочастиц, взвешенных в приземном слое атмосферного воздуха города Владивостока

Исследования последних лет свидетельствуют о различиях патогенных свойств микрочастиц, загрязняющих воздушную среду разных регионов. Современные научные представления о механизмах воздействия ТВЧ связывают с различными характеристиками их фракционного и качественного состава. Важным фактором воздействия является размерность или аэродинамический диаметр частиц, и в представленном массиве исследований можно увидеть деление всех ТВЧ на определенные диапазоны, причем применяются как принятые в мировом сообществе понятия – PM_{10} (все частицы в диаметре от 0 до 10 мкм), $PM_{2,5}$ (все частицы в диаметре от 0 до 2,5 мкм) и PM_{10} (все частицы в диаметре от 0 до 10 мкм), так и диапазоны фракций частиц – от 0 до 0,1 (наноразмерный диапазон), от 0,1 до 2,5 мкм (мелкодисперсный диапазон), от 2,5 до 10 мкм и более (крупнодисперсные частицы).

Так как размер определяет глубину проникновения ТВЧ в дыхательные пути человека, нами были выделены патофизиологические диапазоны размерности частиц в зависимости от точки осаждения в легких, эффективности элиминации частиц, возможных механизмов воздействия. Поскольку органы дыхания являются «входными воротами» для ингалируемых микрочастиц, то непосредственное воздействие ТВЧ начинается в момент их оседания на слизистую оболочку респираторного тракта. В зависимости от размера микрочастицы могут оседать в различных отделах дыхательной системы. Крупнодисперсные частицы оседают на поверхности носовой полости и проводящих путей: трахее и бронхов, где основным механизмом удаления является мукоцилиарный клиренс. Мелкодисперсные частицы проникают значительно глубже, в нижние дыхательные пути, достигая при вдыхании

области бронхиол и альвеол [139], где отсутствует реснитчатый эпителий в выстилке воздухоносных путей. Наноразмерные частицы сопоставимы с толщиной плазмалеммы и способны проходить клеточные мембраны, являясь потенциально самыми опасными частицами [56, 85, 89, 116, 118, 151, 161].

В нашем исследовании проведено определение фракционного состава ТВЧ приземного слоя атмосферного воздуха двух различных по техногенной нагрузке районов города Владивостока в патофизиологических диапазонах размерности фракций: 0–0,1 мкм; 0,1–1 мкм; 1–2,5 мкм; 2,5–10 мкм; 10–100 мкм; 100–2000 мкм (рисунок 7).

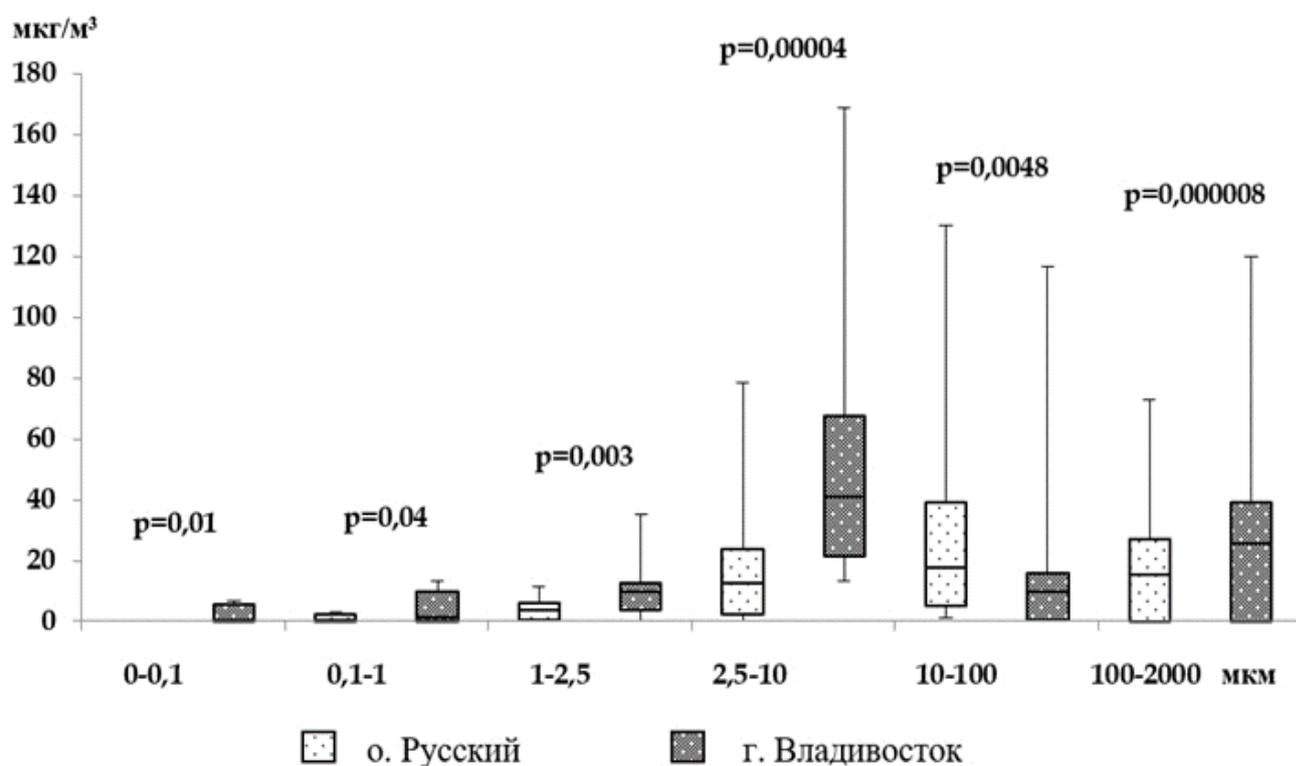


Рисунок 7 – Концентрация твердых взвешенных частиц различной дисперсности в приземном слое атмосферного воздуха районов г. Владивостока с разной степенью техногенной нагрузки, мкг/м³.

В качестве района с незначительной техногенной нагрузкой был выбран остров Русский, характеризующийся отсутствием заводов и крупных предприятий, незначительной плотностью селитебной застройки. Основными источниками загрязнения атмосферного воздуха в данном районе являются

грунтовые дороги с высокой степенью пылимости. Район Вторая речка с высокой плотностью селитебной застройки, загрязнением атмосферного воздуха выбросами мусоросжигательного завода и высоким автомобильным трафиком был выбран как район с высокой степенью техногенной нагрузки. Сначала для оценки загрязнения были определены массовые концентрации твердых микрочастиц, загрязняющих приземный слой атмосферного воздуха. Результаты исследования показали различия в концентрации изучаемых диапазонов ТВЧ между районами с разной техногенной нагрузкой. Концентрация ультратонких частиц (0–0,1 мкм) в районе со значительной техногенной нагрузкой (г. Владивосток) составила 0,6 (0; 5,5) мкг/м³, в то время как в районе с незначительной техногенной нагрузкой (о. Русский) ультратонкие частицы не были обнаружены ($p=0,01$). Ультрадисперсные взвешенные частицы обнаружены только в районе со значительной техногенной нагрузкой, что обусловлено наличием постоянного источника генерации ТВЧ в наноразмерном диапазоне. Наибольшие различия в концентрации ТВЧ выявлены среди частиц в диапазоне 0,1–1 мкм. По сравнению с районом с незначительной техногенной нагрузкой в г. Владивостоке зафиксированная концентрация выше в 5 раз и составила 1,5 (0; 6,7) мкг/м³, в районе с незначительной техногенной нагрузкой – 0,3 (0; 2,5) мкг/м³ ($p=0,04$).

Мелкодисперсные частицы от 1 до 2,5 мкм в диаметре в районе со значительной техногенной нагрузкой были определены в концентрации 9,8 (3,8; 12,7) мкг/м³, что в 2,7 раза выше уровня загрязнения на о. Русский, где их содержание составило 3,6 (0,5; 6,0) мкг/м³ ($p=0,003$).

Из представленных на рисунке 7 данных видно, что установленная концентрация крупнодисперсных частиц с аэродинамическим диаметром от 2,5 до 10 мкм в г. Владивостоке превысила в 3,3 раза их содержание в районе с незначительной техногенной нагрузкой и составила 41,0 (21,3; 67,4) мкг/м³. При этом на о. Русский они обнаружены в концентрации 12,5 (2,3; 23,5) мкг/м³ ($p=0,00004$). Содержание частиц PM_{10} в диапазоне фракции от 10 до 100 мкм выявлено в 1,8 раз выше на о. Русский, где загрязнение зафиксировано на

уровне 17,5 (5,1; 38,9) мкг/м³, тогда как в районе со значительной техногенной нагрузкой эти частицы определены в концентрации 9,9 (0,4; 15,8) мкг/м³ (p=0,0045).

В то же время концентрация частиц PM>10 в диапазоне фракции от 100 до 2000 мкм в районе с высокой техногенной нагрузкой выше в 1,8 раза по сравнению с благоприятной зоной. Полученные значения уровня загрязнения в неблагоприятной зоне г. Владивостока составили 25,8 (0; 39,2) мкг/м³, а в районе с незначительной техногенной нагрузкой – 14,5 (0; 27,2) мкг/м³ (p=0,000008). PM>10 вследствие гравитационного осаждения незначительное время находятся в атмосферном воздухе, а при попадании в дыхательные пути задерживаются в носовой полости и выводятся из организма.

Таким образом, установлено содержание ТВЧ приземного слоя атмосферного воздуха г. Владивостока с использованием диапазонов размерности частиц, характеризующихся определенными патофизиологическими механизмами воздействия на организм человека. Полученные результаты свидетельствуют о различиях в содержании фракций ТВЧ в зависимости от техногенного прессинга. В атмосферном воздухе урбанизированной территории с высокой техногенной нагрузкой преобладают частицы микроразмерного диапазона, оказывающие наиболее патогенное воздействие на организм человека. Характеристикой загрязнения территории с незначительной техногенной нагрузкой является преобладание грубой фракции с размерностью более 10 мкм.

На основании полученных данных о концентрации ТВЧ в приземном слое атмосферного воздуха в двух районах г. Владивостока был рассчитан фракционный состав частиц для формирования модельных взвесей, использованных в экспериментальном исследовании по нагрузке альвеолярных макрофагов. Модельная взвесь № 1 характеризовала загрязнение воздушной среды в районе с незначительной техногенной нагрузкой, модельная взвесь № 2 – район с высокой техногенной нагрузкой. В диапазоне размеров 0-0,1 мкм доля ТВЧ в модельной взвеси № 2 составила 8,1%, в модельной взвеси № 1 – 0%;

частицы в диапазоне от 0,1 до 1 мкм мелкодисперсной фракции – 19,7% и 1,6%, соответственно; частицы в диапазоне от 1 до 2,5 мкм мелкодисперсной фракции составили 6,3% в модельной взвеси № 2, в то время как в модельной взвеси № 1 – 3,3%; доля частиц с размерностью 2,5-10 мкм – 36,3% и 17,3%, соответственно; в диапазоне фракции от 10 до 100 мкм – 29,6% в модельной взвеси № 2 и 77,5% – в модельной взвеси № 1; доля частиц с размерностью 100-1000 мкм составила 0% в модельной взвеси № 2 и 0,3% в модельной взвеси № 1. Рассчитанный дисперсный состав показал различия в содержании ТВЧ приземного слоя атмосферного воздуха типичных, характерных для территории города Владивостока, районах с высокой и незначительной техногенной нагрузкой.

Расчет дозы нагрузки был проведен с учетом анализа значительного массива литературных данных о проведении экспериментальных исследований, базирующихся на принципах экотоксикологии, методических рекомендаций по изучению токсичности наноматериалов [6, 141, 144, 153]. Для расчета использованы данные о частоте дыхания, дыхательном объеме легких, веса легких и числа альвеолярных макрофагов в 1 г легочной ткани человека и экспериментальных животных [153]. Концентрация ТВЧ, поступивших в легкие человека за 1 мин, при условии 100% осаждения ингалированных частиц, была взята по району с незначительным техногенным прессингом и пересчитана на минутный объем дыхания экспериментального животного. Далее, исходя из общего количества альвеолярных макрофагов на общий вес легких, был проведен расчет на 100 тыс. клеток. Доза нагрузки составила 1 мкг/100 тыс. клеток.

До и после нагрузки проводилась оценка жизнеспособности клеток, доля «живых клеток» после нагрузки во 2-й и 3-ей группах составила не менее 85% и не имела статистически значимых различий между 2-ой и 3-ей группами.

3.2. Оценка прооксидантных процессов в альвеолярных макрофагах крыс линии Вистар при нагрузке модельными взвесями

Ингаляционный путь поступления ТВЧ определяет зону непосредственного контакта и проникновения микрочастиц в организм. Индуцируя образование активных форм кислорода, в том числе альвеолярными макрофагами (АМ) при выполнении ими защитных функций, ТВЧ способствуют развитию окислительного стресса в клетках дыхательных путей. На основании анализа предполагаемых триггерных механизмов был выбран комплекс методов для оценки формирования окислительного стресса и механизмов его регуляции при воздействии ТВЧ атмосферного воздуха на макрофаги бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) экспериментальных животных [24]. Поскольку основным «инструментом» такой деструкции являются АФК, атакующие и разрушающие биологически важные молекулы, то в качестве маркеров в эксперименте *in vitro* были использованы и оценены продукты, образующиеся в процессе формирования окислительного стресса.

Для липидов определяли содержание первичных и конечных продуктов пероксидации – ГПЛ и малонового диальдегида (МДА), для белков – протеин карбонил, для выявления генотоксичности определяли содержание 8-ОХДГ [24]. Изменение содержания данных параметров в культуре клеток характеризовало процессы перекисного окисления внутриклеточных структур АМ, а появление их в культуральной среде говорило о нарушении целостности как мембранных структур, так и самой клеточной мембраны. Содержание продуктов пероксидации во 2-ой и 3-ей группах макрофагов БАЛ с нагрузочными тестами характеризовало воздействие твердых взвешенных частиц, содержащихся в модельных взвесях атмосферного воздуха.

Окисление липидов. АФК, вызывая перекисное окисление липидов, нарушают расположение мембранного липидного бислоя, что может инактивировать мембранные связанные рецепторы и ферменты и увеличивать

проницаемость клеточной мембраны. Продукты перекисного окисления липидов являются косвенными биомаркерами окислительного стресса. ГПЛ и МДА определяли в культурах альвеолярных макрофагов и среде их культивирования. Являясь чувствительной точкой приложения для АФК, мембранные липиды подвергаются пероксидации, приводя к образованию липопероксидов и дальнейшей активации пероксидации, с образованием конечных продуктов ПОЛ. Характеристика вышеперечисленных показателей представлена в таблицах 3 и 4. В 1-й группе АМ наблюдается наименьший уровень ГПЛ в культуре альвеолярных макрофагов и среде их культивирования относительно других групп (таблица 3).

Таблица 3 – Концентрация ГПЛ (усл. ед.) в исследуемых группах альвеолярных макрофагов (Me, Q₁ – Q₃)

Исследуемые группы	Культура АМ		Среда культивирования		Суммарное содержание	
	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃
1-я группа (n=17), контрольная	1,36	1,14–1,62	1,86	1,54–2,62	3,22	3,14–4,20
2-я группа (n=17), воздействие модельной взвеси № 1	1,75	1,06–2,18	1,31	0,96–1,72	3,03	2,56–3,76
3-я группа (n=17), воздействие модельной взвеси № 2	2,06	1,58–3,08	1,74	1,28–2,60	4,18	2,94–5,28
Уровень значимости, p	p ₁₋₃ =0,028		p ₂₋₃ =0,035		p ₁₋₃ =0,048 p ₂₋₃ =0,007	

Уровень ГПЛ в культуре альвеолярных макрофагов 2-ой группы не имел статистически значимых различий по сравнению с 1-ой группой. Это свидетельствовало о том, что микрочастицы модельной взвеси № 1 не оказывают выраженного воздействия на клетки, так как в этой взвеси преобладали частицы (78%) в диапазоне фракции 10–140 мкм, размер которых

не позволял клеткам их поглотить (таблица 1, рисунок 5А). В то же время фагоцитоз незначительного количества мелкодисперсных частиц (5%) в диапазоне фракции от 0,1 до 2,5 мкм не вызывал статистически значимых по сравнению с контрольной группой изменений в концентрации ГПЛ. Уровень ГПЛ в культуре клеток 3-ей группы увеличен в полтора раза (на 51%, $p=0,028$) по сравнению с физиологическим уровнем. Поскольку в модельной взвеси № 2 содержится около двух третей твердых взвешенных частиц микроразмерного диапазона (PM_{10} – 70%), из которых фагоцитозу поддаются более трети ($PM_{2,5}$ – 34%) (таблица 2, рисунок 5Б), в клетках начинают усиливаться процессы, интенсифицирующие ПОЛ, что подтверждается увеличением концентрации первичных продуктов в макрофагах.

В культуральной среде содержание ГПЛ не различается между опытными и контрольной группами, однако имеются статистически значимые различия содержания ГПЛ (на 33%, $p=0,035$) между 2-ой и 3-ей группами. Можно предположить, что воздействие модельной взвеси, соответствующей составу ТВЧ атмосферного воздуха территории с незначительным техногенным прессингом, не вызывает нарушение целостности альвеолярных макрофагов вследствие незначительного количества фагоцитированных микрочастиц. Большее содержание ГПЛ в культуральной среде АМ, подвергнутой воздействию модельной взвеси, характеризующей загрязнение атмосферного воздуха территории с высоким техногенным прессингом, может быть связано с разрушением макрофагов, а отсутствие различий с контрольной группой обусловлено дальнейшим протеканием процессов ПОЛ с образованием конечных продуктов.

Содержание гидроперекисей липидов суммарно в культуре альвеолярных макрофагов и среде их культивирования в 1-ой и 2-ой группах не имеет различий, однако для 3-ей группы различия статистически значимы: выше на 30% ($p=0,048$) по сравнению с 1-ой группой и на 38% ($p=0,007$) по сравнению со 2-ой [16]. Это обусловлено усилением генерации АФК клеткой в ответ на воздействие содержащихся в модельной взвеси № 2 твердых взвешенных

микрочастиц и перекисидацией липидов, что и подтверждается уровнем образования ГПЛ в макрофагах.

Уровень МДА в 1-ой группе, как в культуре альвеолярных макрофагов, так и в среде их культивирования имеет наименьшее значение по отношению к двум другим группам (таблица 4). Поскольку МДА является конечным продуктом перекисного окисления липидов, такие небольшие значения говорят об относительно низкой интенсивности процессов перекисидации.

Таблица 4 – Концентрация МДА (ммоль/л) в исследуемых группах альвеолярных макрофагов (Me, Q₁ – Q₃)

Исследуемые группы	Культура АМ		Среда культивирования		Суммарное содержание	
	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃
1-я группа (n=17), контрольная	1,3	1,25–1,31	1,44	1,30–1,54	1,37	1,27–1,43
2-я группа (n=17), воздействие модельной взвеси № 1	1,6	1,54–1,72	1,74	1,66–1,81	1,67	1,60–1,77
3-я группа (n=17), воздействие модельной взвеси № 2	2,34	1,97–2,48	2,31	2,18–2,42	2,33	2,08–2,45
Уровень значимости, p	p ₁₋₂ =0,042 p ₁₋₃ =0,0006 p ₂₋₃ =0,003		p ₁₋₂ =0,035 p ₁₋₃ =0,007 p ₂₋₃ =0,028		p ₁₋₂ =0,032 p ₁₋₃ =0,0065 p ₂₋₃ =0,024	

В культуре клеток 2-ой группы содержание МДА повышено по отношению к значению 1-ой группы на 23% (p=0,042). Уровень МДА в 3-ей группе альвеолярных макрофагов наиболее отличается от уровня контроля: выше на 80% (p=0,0006), а по отношению ко 2-ой группе выше на 46% (p=0,003). Интенсификация процессов ПОЛ внутри клетки наблюдается при воздействии модельной взвеси № 2, содержащей наибольшее количество мелкодисперсных частиц с диаметром до 2,5 мкм. Эти частицы совпадают с размерами бактериальной клетки и чаще фагоцитируются АМ, что обуславливает их большую патогенность.

Содержание МДА в культуральной среде 2-ой группы повышено по отношению к содержанию в контрольной группе на 21% ($p=0,035$). Концентрация МДА в культуральной среде 3-ей группы альвеолярных макрофагов наиболее отличается от уровня интактной группы: превышение составило 60% ($p=0,007$), а по отношению ко 2-ой группе выше на 33% ($p=0,028$). Это, вероятно, связано с преобладанием практически в 7 раз в модельной взвеси № 2 легко фагоцитируемых мелкодисперсных ТВЧ, приводящих к разрушению клетки и обнаружению ее содержимого в культуральной среде.

Суммарное содержание МДА в культуре и среде культивирования во 2-ой группе выше по сравнению с группой контроля на 21,9% ($p=0,032$), то время как в 3-ей группе уровень МДА на 70% ($p=0,0065$) превышает значение интактной группы и на 39,5% ($p=0,024$) – содержание во 2-ой группе. ТВЧ, входящие в состав модельной взвеси № 2 и представляющие собой смесь преимущественно мелкодисперсных фракций (PM_1 , $PM_{2,5}$, PM_{10}) (таблица 2, рисунок 5Б), обладают выраженным прооксидантным эффектом, что и повышает уровень продукции МДА. Это также хорошо заметно и во 2-ой группе.

Полученная динамика содержания ГПЛ и МДА в культуре альвеолярных макрофагов БАЛ и среде культивирования свидетельствует об интенсификации процессов липопероксидации после воздействия модельных взвесей ТВЧ. При этом уровень интенсификации ПОЛ наиболее выражен при действии модельной взвеси № 2, характеризующей содержание ТВЧ в атмосферном воздухе территории с высоким уровнем техногенного загрязнения.

Окисление белков. Окисление белка представляет собой модификацию белка, вызванную либо прямыми реакциями с АФК, либо косвенными реакциями с вторичными побочными продуктами окислительного стресса. Белки имеют различные и в то же время уникальные биологические функции, и их окисление может привести к структурным и функциональным изменениям, таким как ингибирование ферментативной и связывающей активности,

повышенная восприимчивость к агрегации и протеолизу, измененная иммуногенность. Образовавшиеся пероксиды белка, в свою очередь, окисляют белковые и другие биомолекулы. В отличие от H_2O_2 , который быстро удаляется ферментативным путем, окисленные белки расщепляются очень медленно, подвергаясь в последующем катаболизму посредством протеосомных и лизосомных путей, но некоторые из них плохо, либо совсем не разлагаются и накапливаются в клетках.

С целью обнаружения модифицированных белков, подвергнутых карбонилированию, определяли содержание протеин карбонила в сравниваемых группах альвеолярных макрофагов (таблица 5).

Таблица 5 – Концентрация протеин карбонила (нмоль/мг) в исследуемых группах альвеолярных макрофагов (Me, $Q_1 - Q_3$)

Исследуемые группы	Среда культивирования	
	Me	$Q_1 - Q_3$
1-я группа (n=17), контрольная	0,8	0,75–0,91
2-я группа (n=17), воздействие модельной взвеси № 1	1,3	1,28–1,4
3-я группа (n=17), воздействие модельной взвеси № 2	1,95	0,83–2,0
Уровень значимости, p	$p_{1-2}=0,0001$ $p_{1-3}=0,0001$ $p_{2-3}=0,0001$	

Одна группа клеток оставалась интактной и явилась контролем, 2-ая группа подверглась воздействию модельной взвеси № 1, характеризующей загрязнение атмосферного воздуха района с незначительной техногенной нагрузкой, 3-я группа АМ была нагружена ТВЧ модельной взвеси № 2, идентичной по составу частиц району г. Владивостока с высоким техногенным прессингом. Уровень протеин карбонила в культуральной среде 2-ой группы выше контроля в 1,6 раза ($p=0,0001$). Наибольшее увеличение содержания продуктов пероксидации белков выявлено в 3-ей группе, протеин карбонил увеличен в 2,5 раза ($p=0,0001$) по отношению к контролю, по сравнению со 2-ой группой уровень протеин карбонила выше на 54% ($p=0,0001$) что также

указывает на прооксидантный эффект мелкодисперсных ТВЧ. Полученные различия в содержании протеин карбонила в культуральной среде макрофагов, нагруженных модельными взвесями, говорят о различиях в окислительных свойствах ТВЧ. Наибольший результат был получен в группе АМ, нагруженных модельной взвесью № 2, идентичной по составу частиц району г. Владивостока с высокой техногенной нагрузкой.

Окисление ДНК. АФК могут приводить к модификации ДНК несколькими способами, которые включают деградацию оснований, одноцепочечные или двухцепочечные разрывы ДНК, делеции или транслокации и перекрестное связывание с белками. В результате окислительного повреждения ДНК активными формами кислорода образуется 8-гидрокси-2'-деоксигуанозин (8-ОХДГ). С целью определения токсического повреждения генетического материала альвеолярных макрофагов, опосредуемого развитием окислительного стресса после воздействия ТВЧ *in vitro*, был определен указанный параметр (таблица 6).

Таблица 6 – Концентрация 8-ОХДГ (нг/мл) в исследуемых группах альвеолярных макрофагов (Me, Q₁ – Q₃)

Исследуемые группы	Среда культивирования	
	Me	Q ₁ – Q ₃
1-я группа (n=17), контрольная	0,2	0,16–0,25
2-я группа (n=17), воздействие модельной взвеси № 1	0,32	0,29–0,36
3-я группа (n=17), воздействие модельной взвеси № 2	0,41	0,37–0,46
Уровень значимости, p	p ₁₋₂ =0,0001 p ₁₋₃ =0,0001 p ₂₋₃ =0,0001	

В культуральной среде интактной группы содержание 8-ОХДГ имело наименьшее значение. Воздействие модельной взвеси № 1, характеризующей территорию с незначительным техногенным прессингом, привело к увеличению содержания 8-ОХДГ в среде культивирования 2-ой группы на 67% (p=0,0001) по сравнению с интактной группой. При нагрузке модельной взвесью № 2,

идентичной загрязнению атмосферного воздуха территории с высоким техногенным прессингом, концентрация 8-ОХДГ в среде культивирования 3-ей группы увеличена в 2 раза относительно значений контрольной группы ($p=0,0001$) и на 20% по отношению ко 2-ой группе ($p=0,0001$).

Образование 8-ОХДГ свидетельствует об интенсификации окислительного стресса, приводящей к повреждению генетических структур клетки, причем увеличение уровня этого показателя наблюдается при воздействии модельной взвеси № 2, характеризующейся преобладанием мелкодисперсных фракций ТВЧ.

3.3. Антиоксидантные защитные и репаративные механизмы в альвеолярных макрофагах крыс линии Вистар

Образование АФК, также как и окисление макромолекул в клетках происходит постоянно, поскольку большинство реакций связано с окислением и восстановлением. Однако усиление окислительных процессов может приводить к образованию значительного количества дестабилизирующих и разрушающих структуру клетки метаболитов. Антиоксидантная система (АОС) предотвращает подобные реакции и поддерживает окислительно-восстановительный баланс клетки за счет метаболизма веществ белковой и небелковой природы, взаимодействующих с АФК и продуктами окисления, в том числе перекисного окисления липидов, белков, ДНК. АОС представляет собой комплекс различных веществ, как высокомолекулярных (например, тиоредоксин, глутаредоксин, глутатионредуктаза и др.), так и низкомолекулярных (глутатион, витамины С, Е и др.).

Сравнительная характеристика общей антиоксидантной активности. В исследовании был использован показатель, описывающий общую антиоксидантную активность (АОА) или общий антиоксидантный статус, и позволяющий выяснить резервы антиоксидантной защиты (АОЗ), а так же обнаружить наличие отклонений в окислительно-восстановительном балансе. Данные о содержании общей АОА в культуре клеток и культуральной среде исследуемых групп после нагрузки модельными взвесями микроразмерных ТВЧ представлены в таблице 7.

В культуре клеток наблюдаются статистически значимые отличия между тремя группами, что говорит об изменении окислительно-восстановительного баланса. По сравнению с контрольной группой уровень общей АОА увеличен на 31% ($p=0,0012$) во 2-ой группе, а после воздействия модельной взвеси № 2 показатель увеличен в 2,7 раза ($p=0,0001$). В 3-ей группе относительно 2-ой общая АОА также выше в 2,1 раза ($p=0,0002$). Увеличение показателя общей

АОА в опытных группах свидетельствует об усилении ответной реакции на нагрузку частицами фагоцитируемых размеров обеих модельных взвесей, при этом в клетках 3-ей группы изменения со стороны АОС наиболее выражены.

Таблица 7 – Концентрация общей АОА (ммоль/л) в исследуемых группах альвеолярных макрофагов (Me, Q₁ – Q₃)

Исследуемые группы	Культура АМ		Среда культивирования		Суммарное содержание	
	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃
1-я группа (n=17), контрольная	1,43	1,12–1,59	1,65	1,25–1,72	1,54	1,27–1,66
2-я группа (n=17), воздействие модельной взвеси № 1	1,87	1,77–1,94	2,05	1,79–2,36	1,96	1,78–2,15
3-я группа (n=17), воздействие модельной взвеси № 2	3,83	3,25–4,35	3,16	2,91–3,79	3,49	3,27–4,07
Уровень значимости, p	p ₁₋₂ =0,0012 p ₁₋₃ =0,0001 p ₂₋₃ =0,0002		p ₁₋₂ =0,04 p ₁₋₃ =0,0002 p ₂₋₃ =0,0066		p ₁₋₂ =0,036 p ₁₋₃ =0,0002 p ₂₋₃ =0,0057	

В среде культивирования имеются аналогичные различия в активности АОС: уровень общей АОА группы альвеолярных макрофагов после нагрузки ТВЧ, характеризующих загрязнение территории с незначительной техногенной нагрузкой, выше на 24% (p=0,04) относительно значений интактной группы. Для 3-ей группы концентрация общей АОА выше на 92% (p=0,0002) относительно контроля, а по сравнению со 2-ой группой увеличена на 54% (p=0,0066). Таким образом, в культуральной среде активность АОС сохраняется, что необходимо для эффективной защиты клеточной мембраны от высоко реакционноспособных соединений, постоянно образующихся во внеклеточном пространстве в результате воздействия ТВЧ модельных взвесей.

Анализ суммарного содержания показателя общей АОА для культуры клеток и культуральной среды показал следующие изменения окислительно-восстановительного гомеостаза: уровень общей АОА во 2-ой группе альвеолярных макрофагов выше на 27% (p=0,036) в сравнении с группой

9 контроля, а в 3-ей группе концентрация выше в 2,3 раза ($p=0,0002$) относительно интактной группы и на 78%⁶ по отношению ко 2-ой группе. Наличие даже небольшой доли (4,9%) частиц¹³ мелкодисперсных фракций, как в модельной взвеси № 1 (таблица 1), активирует клетки, при этом патогенное воздействие ТВЧ нейтрализуется за счет увеличения активности антиоксидантной системы, направленной на ликвидацию последствий этого воздействия. В случае воздействия ТВЧ модельной взвеси № 2 увеличение содержания общей АОА подтверждает прооксидантный эффект мелкодисперсных частиц. Компоненты АОС в норме всегда присутствуют и в цитоплазме клеток, и во внеклеточном матриксе, и в тканевой жидкости. Повышение их уровня свидетельствует об увеличении количества свободных радикалов, что и происходит в присутствии частиц мелкодисперсных фракций. Генерацию АФК и других радикалов клетка стабилизирует за счет активного синтеза антиоксидантных веществ. И пока у клеток имеется достаточно ресурсов для поддержания такого «нестабильного» гомеостаза, они продолжают функционировать.

Тиолдисульфидное звено системы антиоксидантной защиты.

Внутриклеточные редокс системы, наиболее чувствительные к превалированию пероксидативных процессов, представлены в основном тиол-зависимыми глутатионовой и тиоредоксиновой системами. Для изучения механизма АОЗ альвеолярных макрофагов при окислительном стрессе, вызванном воздействием⁴ микрочастиц атмосферного воздуха, необходимо определить роль тиолдисульфидного звена данной системы. Полученные данные ответной реакции глутатионовой системы АОЗ альвеолярных макрофагов крыс линии Вистар *in vitro* представлены в таблицах 8–10.

В культуре клеток уровень окисленного глутатиона в группах, нагруженных модельными взвесями, отличается от содержания в контрольной группе, в то время как между 2-ой и 3-ей группами статистически значимых³⁶ различий не выявлено. Уровень окисленного глутатиона во 2-ой и 3-ей группах выше уровня первой в 2,1 и 2,2 раза ($p=0,034$), соответственно. Такое

значительное отличие от контрольной группы может свидетельствовать об интенсификации ПОЛ в группах нагруженных микрочастицами альвеолярных макрофагов и достаточно высокой активности глутатионпероксидазы, приводящей к образованию окисленного глутатиона.

Таблица 8 – Концентрация окисленного глутатиона (мкмоль/л.) в исследуемых группах альвеолярных макрофагов (Me, Q₁ – Q₃)

Исследуемые группы	Культура АМ		Среда культивирования		Суммарное содержание	
	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃
1-я группа (n=17), контрольная	2,95	2,93–2,96	6,3	6,13–6,88	9,15	9,01–10,29
2-я группа (n=17), воздействие модельной взвеси № 1	6,41	6,25–6,46	4,81	3,05–6,78	11,27	9,48–13,06
3-я группа (n=17), воздействие модельной взвеси № 2	6,2	6,09–6,31	6,77	6,33–7,14	12,98	12,64–13,22
Уровень значимости, p	p ₁₋₂ =0,034 p ₁₋₃ =0,034				p ₁₋₃ =0,034	

Таблица 9 – Концентрация восстановленного глутатиона (мкмоль/л.) в исследуемых группах альвеолярных макрофагов (Me, Q₁ – Q₃)

Исследуемые группы	Культура АМ		Среда культивирования		Суммарное содержание	
	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃
1-я группа (n=17), контрольная	31,29	26,48–33,21	38,89	36,99–44,16	71,53	65,38–79,84
2-я группа (n=17), воздействие модельной взвеси № 1	27,13	25,14–32,23	26,23	22,67–26,35	51,76	51,49–62,11
3-я группа (n=17), воздействие модельной взвеси № 2	23,52	24,02–26,07	23,52	21,01–27,05	50,28	46,48–53,38
Уровень значимости, p			p ₁₋₂ =0,034 p ₁₋₃ =0,0495		p ₁₋₃ =0,0495	

В то время как концентрация восстановленного и общего глутатиона, для которых не выявлено статистически значимых различий, в культурах альвеолярных макрофагов и 2-ой, и 3-ей групп свидетельствует о способности

клеток за счет действия глутатионредуктазы частично восстанавливать окисленный глутатион и поддерживать окислительно-восстановительный баланс на стационарном уровне. Таким образом, повышение содержания окисленного глутатиона в культуре альвеолярных макрофагов 2-ой и 3-ей групп является результатом усиленной детоксикации клетками избыточного количества гидропероксидов и одним из признаков усиления пероксидации липидов.

Таблица 10 – Концентрация общего глутатиона (мкмоль/л) в исследуемых группах альвеолярных макрофагов (Me, Q₁ – Q₃)

Исследуемые группы	Культура АМ		Среда культивирования		Суммарное содержание	
	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃
1-я группа (n=17), контрольная	31,34	24,16–38,07	44,13	43,25–54,13	80,73	69,33–93,66
2-я группа (n=17), воздействие модельной взвеси № 1	38,67	31,62–45,82	25,67	20,65–29,44	66,28	61,06–71,49
3-я группа (n=17), воздействие модельной взвеси № 2	31,36	29,01–33,05	30,34	25,62–36,11	64,04	55,96–68,48
Уровень значимости, p			p ₁₋₂ =0,0495 p ₁₋₃ =0,0495		p ₁₋₃ =0,0495	

В среде культивирования статистически значимых различий в содержании окисленного глутатиона не выявлено, так как макрофаги не экзоцитируют его. Для восстановленного глутатиона наблюдается обратная картина: концентрация во 2-ой группе снижена на 32,5% (p=0,034), а в 3-ей – на 39,5% (p=0,0495) по отношению к группе контроля. Для общего глутатиона так же характерно снижение во 2-ой группе – уровень ниже на 42% (p=0,0495), в 3-ей группе – на 31% (p=0,0495) по отношению к контрольной. Снижение содержания общего и восстановленного глутатиона в культуральной среде для 2-ой и 3-ей групп по сравнению с интактной группой может быть связано с уменьшением экзоцитоза восстановленного глутатиона, так как он больше необходим внутри клетки для осуществления антиоксидантной защиты. Суммарное содержание общего,

окисленного и восстановленного глутатиона в группе 2 не имеет отличий от значений группы контроля, что свидетельствует об адекватности работы системы восстановления глутатиона. В группе 3 наблюдаются отличия по сравнению с 1-ой: содержание общего глутатиона снижено на 21% ($p=0,0495$), восстановленного глутатиона – на 30% ($p=0,0495$), уровень окисленного глутатиона повышен на 42% ($p=0,034$). Причиной снижения содержания общего и восстановленного глутатиона и увеличения уровня окисленного глутатиона, по-видимому, является возрастание концентрации ГПД при воздействии модельной взвеси ТВЧ, идентичной по содержанию частиц атмосферному воздуху района с высокой техногенной нагрузкой.

Восстановление биомолекул, поврежденных воздействием перекисидации, регулируется репарационными ферментами. Ключевым антиоксидантом, осуществляющим защиту белковых молекул от оксидативного повреждения после воздействия микрочастиц воздушной среды, является тиоредоксин [4, 106]. Уровни образования тиоредоксина в культуре альвеолярных макрофагов *in vitro* после нагрузки модельными взвесями микрочастиц атмосферного воздуха районов с различным техногенным прессингом, представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Концентрация тиоредоксина (нг/мл) в исследуемых группах альвеолярных макрофагов (Me, $Q_1 - Q_3$)

Исследуемые группы	Культура АМ		Среда культивирования		Суммарное содержание	
	Me	$Q_1 - Q_3$	Me	$Q_1 - Q_3$	Me	$Q_1 - Q_3$
1 группа (n=17), контрольная	2,6	2,2–2,8	5,35	4,49–6,8	3,98	3,35–4,8
2 группа (n=17), воздействие модельной взвеси № 1	4,3	3,1–5,5	49,0	34,0–56,0	16,57	14,20–18,12
3 группа (n=17), воздействие модельной взвеси № 2	5,2	4,2–5,47	70,5	63,7–79,2	37,85	33,95–42,34
Уровень значимости, p	$p_{1-2}=0,0021$ $p_{1-3}=0,0006$		$p_{1-2}=0,00004$ $p_{1-3}=0,00002$ $p_{2-3}=0,0045$		$p_{1-2}=0,000035$ $p_{1-3}=0,00002$ $p_{2-3}=0,0013$	

В культуре клеток содержание тиоредоксина различается между контрольной группой и опытными группами: уровень тиоредоксина увеличен на 65% ($p=0,0021$) для группы 2 и в 2 раза ($p=0,0006$) для группы 3. В тоже время между опытными группами отсутствуют статистически значимые различия в содержании тиоредоксина. Повышение уровня тиоредоксина в опытных группах, вероятно, говорит об усилении протекания окислительных внутриклеточных реакций в результате фагоцитоза микрочастиц, причем в процесс окисления вовлекаются как липидные, так и белковые структуры АМ.

Содержание тиоредоксина в культуральной среде для всех трех групп выше, чем в культуре клеток. Здесь же наблюдаются и более сильные различия в его содержании по группам. Во 2-ой группе содержание тиоредоксина выше, чем в первой, в 9 раз ($p=0,00004$). Для 3-ей группы уровень тиоредоксина в 13 раз ($p=0,00002$) превышает уровень контроля и на 44% ($p=0,0045$) уровень 2-ой группы, что, скорее всего связано с активным синтезом альвеолярными макрофагами тиоредоксина и его экзоцитозом во внешнюю среду.

Суммарное содержание тиоредоксина также отлично для всех групп: во 2-ой группе содержание в 4 раза выше ($p=0,000035$), чем в интактной, а в 3-ей группе в 9,5 раз превышает ($p=0,00002$) значения контроля, в 2,3 раза выше ($p=0,0013$) в сравнении со 2-ой группой. Это обусловлено тем, что тиоредоксин является фактором хемотаксиса, к тому же он препятствует запуску апоптоза в клетках, который способен активироваться от огромного количества разнообразных факторов, включая АФК.

Таким образом, сравнительная характеристика содержания основных компонентов тиолдисульфидного звена антиоксидантной системы показывает, что воздействие частиц модельных взвесей, характеризующих атмосферное загрязнение обоих районов, уменьшает содержание общего и восстановленного глутатиона в культуральной среде, повышая при этом уровень окисленного глутатиона в культуре клеток. Одновременно с этим происходит усиление синтеза тиоредоксина, участвующего в восстановлении белковых молекул, в

том числе и окисленного глутатиона, хемотаксисе макрофагов и инактивирующего запуск апоптоза в макрофагах.

3.4. Взаимосвязь показателей прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза альвеолярных макрофагов с характеристиками модельных взвесей

Для оценки взаимоотношений между показателями окислительно-восстановительного баланса клетки и дисперсного и качественного состава твердых взвешенных частиц в модельных взвесах, характеризующих различные по уровню техногенного загрязнения атмосферного воздуха районы, были изучены внутрисистемные и межсистемные взаимосвязи. Основной задачей проведенного анализа явилось выявление основных, характерных для конкретного воздействия на альвеолярные макрофаги крыс линии Вистар модельных взвесей ТВЧ, тенденций в реакции клетки на повреждающий фактор на основе статистически значимых корреляционных зависимостей.

Для оценки интегральных взаимоотношений был рассчитан интегральный отклик (мощность) внутрисистемных корреляционных связей (Дв, %) клеточных параметров на воздействие модельных взвесей ТВЧ в культуре клеток и культуральной среде интактной группы и групп, подвергнутых воздействию модельных взвесей, результаты представлены в таблице 12.

В группе контроля Дв в культуре клеток составил 2,4% ($p < 0,05$), а в культуральной среде – 2,9% ($p < 0,05$), что является наименьшими значениями Дв среди всех сравниваемых групп. В группе альвеолярных макрофагов, нагруженных модельной взвесью № 1, соответствующей району с незначительной техногенной нагрузкой, Дв в культуре клеток составил 11,6% ($p < 0,05$), а в культуральной среде – 14,8% ($p < 0,05$), что выше интактной группы в 4,8 и 5,1 раза, соответственно.

Таблица 12 – Интегральный отклик (Дв, $p < 0,05$) параметров окислительно-восстановительного гомеостаза альвеолярных макрофагов на воздействие модельных взвесей ТВЧ, %

Исследуемые группы	Культура АМ	Среда культивирования
1-я группа (n=17), контрольная	2,4	2,9
2-я группа (n=17), воздействие модельной взвеси № 1	11,6	14,8
3-я группа (n=17), воздействие модельной взвеси № 2	19,6	27,1

Мощность интегральных внутрисистемных связей показателей окислительно-восстановительного баланса в группе нагруженных модельной взвесью № 2 альвеолярных макрофагов с характеристиками воздействующего фактора составила 19,6% ($p < 0,05$), что выше значений 1-ой группы в 8,2 раза и в 1,7 раза, чем во 2-ой группе. Среди всех групп в наибольшей степени прореагировала культуральная среда группы АМ, нагруженных модельной взвесью № 2. Дв составил 27,1% ($p < 0,05$), что выше данных всех сравниваемых групп: в 9,3 раза выше, чем в группе контроля и в 1,8 раза, чем во 2-ой группе.

Взаимосвязи клеточных параметров с дисперсным и качественным составом в культуре клеток и культуральной среде альвеолярных макрофагов, нагруженных модельными взвесями ТВЧ, характеризующих состав атмосферного воздуха территорий с высоким и незначительным техногенным прессингом, представлены в таблицах 13–20.

Таблица 13 – Корреляционная связь (r , $p < 0,05$) параметров окислительно-восстановительного гомеостаза с дисперсным составом модельной взвеси № 1 в культуре клеток

Показатели	10–100 мкм
ГПД, усл.ед.	$r=0,57$ $p=0,003$

Примечание: 10–100 мкм – диапазон размерности частиц от 10 до 100 мкм.

Таблица 14 – Корреляционная связь (r , $p < 0,05$) параметров окислительно-восстановительного гомеостаза с качественным составом модельной взвеси № 1 в культуре клеток

Показатели	Металлы, 10–100 мкм	Минералы, 10–100 мкм
ГПЛ, усл.ед.	$r=0,5$ $p=0,006$	$r=0,64$ $p=0,0006$

Примечание: металлы, 10–100 мкм – металлические частицы в диапазоне размерности от 10 до 100 мкм; минералы, 10–100 мкм – минеральные частицы в диапазоне размерности от 10 до 100 мкм.

В культуре клеток альвеолярных макрофагов, подвергнутых воздействию модельной взвеси ТВЧ, идентичной району с незначительной техногенной нагрузкой, обнаружена корреляционная связь ГПЛ с тремя показателями модельной взвеси. Все связи средней силы, характеризуют зависимость уровня ГПЛ от содержания ТВЧ в диапазоне фракции от 10 до 100 мкм ($r=0,57$, $p=0,003$) и качественных характеристик данной фракции: для металлов $r=0,5$, ($p=0,06$) и минералов $r=0,64$, ($p=0,0006$).

Таблица 15 – Корреляционная связь (r , $p < 0,05$) параметров окислительно-восстановительного гомеостаза с дисперсным составом модельной взвеси № 2 в культуре клеток

Показатели	0,1–1 мкм	1–2,5 мкм	2,5–10 мкм	10–100 мкм
ГПЛ, усл.ед.		$r=0,41$ $p=0,017$		
Окисленный глутатион, мкмоль/л		$r=0,38$ $p=0,025$	$r=0,39$ $p=0,02$	$r=0,32$ $p=0,015$
Общий глутатион, мкмоль/л				$r=0,38$ $p=0,022$
Тиоредоксин, нг/мл	$r=0,5$ $p=0,019$	$r=0,7$ $p=0,0007$	$r=0,6$ $p=0,018$	

Примечание: 0,1–1 мкм– диапазон размерности частиц от 0,1 до 1 мкм; 1–2,5 мкм – диапазон размерности частиц от 1 до 2,5 мкм; 2,5–10 мкм – диапазон размерности частиц от 2,5 до 10 мкм; 10–100 мкм – диапазон размерности частиц от 10 до 100 мкм.

Таблица 16 – Корреляционная связь (r , $p < 0,05$) параметров окислительно-восстановительного гомеостаза с качественным составом модельной взвеси № 2 в культуре клеток

Показатели	Сажа 0,1–1 мкм	Сажа 1–2,5 мкм	Сажа, 2,5–10 мкм	Металлы, 2,5–10 мкм	Минералы, 10–100 мкм
ГПЛ, усл.ед.		$r=0,41$ $p=0,017$		$r=0,5$ $p=0,0049$	$r=0,53$ $p=0,003$
АОА, ммоль/л			$r=0,46$ $p=0,008$	$r=0,52$ $p=0,004$	
Окисленный глутатион, мкмоль/л		$r=0,38$ $p=0,025$	$r=0,37$ $p=0,007$		
Общий глутатион, мкмоль/л			$r=0,42$ $p=0,014$	$r=0,51$ $p=0,04$	
Тиоредоксин, нг/мл	$r=0,5$ $P=0,019$	$r=0,7$ $p=0,0007$	$r=0,48$ $p=0,024$		

Примечание: сажа, 0,1–1 мкм – сажа в диапазоне размерности частиц от 0,1 до 1 мкм; сажа, 1–2,5 мкм – сажа в диапазоне размерности частиц от 1 до 2,5 мкм; сажа, 2,5–10 мкм – сажа в диапазоне размерности частиц от 2,5 до 10 мкм; металлы, 2,5–10 мкм – металлические частицы в диапазоне размерности от 2,5 до 10 мкм; минералы, 10–100 мкм – минеральные частицы в диапазоне размерности от 10 до 100 мкм.

Выявлена зависимость 5 показателей окислительно-восстановительного гомеостаза в культуре клеток АМ с составом модельной взвеси № 2, причем уровень связи характеризуется как средний. Однако между уровнем тиоредоксина и содержанием частиц фракции с размерностью от 1 до 2,5 мкм обнаружена сильная связь ($r=0,7$, $p=0,0007$). Наибольшее количество зависимостей клеточных параметров от характеристик модельной взвеси выявлено в диапазоне размерности до 10 мкм. На частицы размерностью от 0,1 до 1 мкм, представленные сажей, прореагировал уровень тиоредоксина ($r=0,5$, $p=0,019$). С частицами размерностью от 1 до 2,5 мкм, представленные сажей, выявлены связи 3-х показателей: ГПЛ ($r=0,41$, $p=0,017$), окисленный глутатион ($r=0,38$, $p=0,025$), тиоредоксин ($r=0,7$, $p=0,0007$). На частицы в диапазоне фракции от 2,5 до 10 мкм ответили 2 показателя окислительно-восстановительного гомеостаза клетки: уровень окисленного глутатиона ($r=0,39$, $p=0,0025$) и уровень тиоредоксина ($r=0,6$, $p=0,018$). От качественной составляющей ТВЧ в диапазоне фракции от 2,5 до 10 мкм (сажа) выявлена

зависимость уровня 4-х показателей: АОА ($r=0,46$, $p=0,008$); окисленный глутатион ($r=0,37$, $p=0,007$); общий глутатион ($r=0,42$, $p=0,014$); тиоредоксин ($r=0,48$, $p=0,024$). С качественной составляющей ТВЧ с размерностью от 2,5 до 10 мкм в диаметре (металлы) обнаружена корреляционная зависимость с 3-мя показателями: ГПЛ ($r=0,5$, $p=0,049$); АОА ($r=0,52$, $p=0,004$) и общий глутатион ($r=0,51$, $p=0,04$). Два показателя окислительно-восстановительного баланса клетки прореагировали на фракцию ТВЧ с размерностью от 10 до 100 мкм: окисленный глутатион ($r=0,32$, $p=0,015$) и общий глутатион ($r=0,38$, $p=0,022$). Выявлена связь уровня ГПЛ ($r=0,53$, $p=0,003$) с минералами в этой размерности.

Таблица 17 – Корреляционная связь (r , $p<0,05$) параметров окислительно-восстановительного гомеостаза с дисперсным составом модельной взвеси № 1 в культуральной среде

Показатели	0,1–1 мкм	1–2,5 мкм	10–100 мкм
Тиоредоксин, нг/мл	$r=0,37$ $p=0,032$	$r=0,6$ $p=0,001$	
ПК, нмоль/мг		$r=0,38$ $p=0,027$	$r=0,45$ $p=0,013$

Примечание: 0,1–1 мкм – диапазон размерности частиц от 0,1 до 1 мкм; 1–2,5 мкм – диапазон размерности частиц от 1 до 2,5 мкм; 10–100 мкм – диапазон размерности частиц от 10 до 100 мкм.

Проведенная оценка зависимости показателей окислительно-восстановительного баланса альвеолярных макрофагов от состава модельной взвеси № 1, идентичной району с незначительной техногенной нагрузкой, показала следующие результаты. Все выявленные зависимости средней силы. Наибольшее количество связей выявлено с фракциями ТВЧ больше 10 мкм в диаметре, а также обнаружены связи мелкодисперсных частиц в диапазоне фракции от 0,1 до 2,5 мкм. Всего четыре клеточных показателя проявляют ответную реакцию на воздействие модельной взвеси № 1. На частицы с аэродинамическим диаметром от 0,1 до 1 мкм, представленные сажой, отреагировал тиоредоксин ($r=0,37$, $p=0,032$).

Таблица 18 – Корреляционная связь (r , $p < 0,05$) параметров окислительно-восстановительного гомеостаза с качественным составом модельной взвеси № 1 в культуральной среде

Показатели	Сажа, 0,1–1 мкм	Сажа, 1–2,5 мкм	Металлы, 10–100 мкм	Минералы, 10–100 мкм	Органика, 10–100 мкм	Минералы, 100–1000 мкм
ГПЛ, усл.ед.			$r=0,38$ $p=0,026$	$r=0,51$ $p=0,006$	$r=0,48$ $p=0,008$	
Малоновый диальдегид, ммоль/л			$r=0,460$ $p=0,0121$			$r=0,460$ $p=0,0111$
Тиоредоксин; нг/мл	$r=0,37$ $p=0,0321$	$r=0,6$ $p=0,001$				$r=0,52$ $p=0,005$
ПК, нмоль/мг		$r=0,38$ $p=0,027$		$r=0,47$ $p=0,011$		

Примечание: сажа, 0,1–1 мкм – сажа в диапазоне размерности частиц от 0,1 до 1 мкм; сажа, 1–2,5 мкм – сажа в диапазоне размерности частиц от 1 до 2,5 мкм; металлы, 10–100 мкм – металлические частицы в диапазоне размерности от 10 до 100 мкм; минералы, 10–100 мкм – минеральные частицы в диапазоне размерности от 10 до 100 мкм; органика, 10–100 мкм – органические частицы в диапазоне размерности от 10 до 100 мкм; минералы, 100–1000 мкм – минеральные частицы в диапазоне размерности от 100 до 1000 мкм.

Воздействие ТВЧ с размерностью от 1 до 2,5 мкм, представляющие собой сажу, характеризовалось зависимостью с 2-мя показателями ответной реакции альвеолярного макрофага – тиоредоксином ($r=0,6$, $p=0,001$) и протеин карбониллом ($r=0,38$, $p=0,027$). Дисперсный состав в диапазоне фракции частиц от 10 до 100 мкм связан с образованием протеин карбонила ($r=0,45$, $p=0,013$). На металлические частицы с размерностью от 10 до 100 мкм среагировали два клеточных параметра: ГПЛ ($r=0,38$, $p=0,026$) и МДА ($r=0,46$, $p=0,012$). Также два показателя АМ – ГПЛ ($r=0,51$, $p=0,026$) и протеин карбонил ($r=0,47$, $p=0,011$) – были связаны с частицами в диапазоне фракции от 10 до 100 мкм минерального происхождения, а на органические частицы этой же размерности прореагировал один показатель – ГПЛ ($r=0,48$, $p=0,008$). ТВЧ минерального происхождения с размерностью от 100 до 1000 мкм были связаны с выработкой клетками МДА ($r=0,46$, $p=0,011$) и тиоредоксина ($r=0,52$, $p=0,005$).

Таблица 19 – Корреляционная связь (r , $p < 0,05$) параметров окислительно-восстановительного гомеостаза с дисперсным составом модельной взвеси № 2 в культуральной среде

Показатели	0–0,1 мкм	0,1–1 мкм	1–2,5 мкм	2,5–10 мкм	10–100 мкм
ГПЛ, усл.ед.				$r=0,37$ $p=0,027$	$r=0,43$ $p=0,014$
МДА, ммоль/л				$r=0,39$ $p=0,022$	
АОА, ммоль/л	$r=0,43$ $p=0,03$	$r=0,4$ $p=0,019$			$r=0,36$ $p=0,009$
Тиоредоксин, нг/мл	$r=0,54$ $p=0,023$	$r=0,57$ $p=0,0012$	$r=0,52$ $p=0,015$		
ПК, нмоль/мг		$r=0,64$ $p=0,0002$		$r=0,62$ $p=0,015$	
8-ОХДГ, нг/мл				$r=0,63$ $p=0,0031$	$r=0,46$ $p=0,009$

Примечание: 0–0,1 мкм – диапазон размерности частиц от 0 до 0,1 мкм; 0,1–1 мкм – диапазон размерности частиц от 0,1 до 1 мкм; 1–2,5 мкм – диапазон размерности частиц от 1 до 2,5 мкм; 2,5–10 мкм – диапазон размерности частиц от 2,5 до 10 мкм; 10–100 мкм – диапазон размерности частиц от 10 до 100 мкм.

Выявленные в культуральной среде корреляционные связи исследованных параметров клетки с качественным и дисперсным составом модельной взвеси ТВЧ, характеризующей загрязнение атмосферного воздуха района с высоким техногенным прессингом, имеют тенденцию аналогичную с культурой клеток, подвергнутых воздействию модельной взвеси № 2. Возросло общее число прореагировавших клеточных показателей, их число составило – 7, причем наибольшее число связей обнаружено с ТВЧ в диапазоне фракции от 0 до 10 мкм.

В культуральной среде 3-ей группы выявлена корреляционная связь фракции ультратонких частиц (наноразмерный диапазон от 0 до 0,1 мкм, представляющие собой сажу) с 2-мя показателями: АОА ($r=0,43$, $p=0,03$) и тиоредоксином ($r=0,54$, $p=0,023$).

Таблица 20 – Корреляционная связь (r , $p < 0,05$) параметров окислительно-восстановительного гомеостаза с качественным составом модельной взвеси № 2 в культуральной среде

Показатели	Сажа, 0–0,1 мкм	Сажа, 0,1–1 мкм	Сажа, 1–2,5 мкм	Сажа, 2,5–10 мкм	Металлы, 2,5–10 мкм	Минералы, 10–100 мкм	Органика, 10–100 мкм
ГПЛ, усл.ед.						$r=0,45$ $p=0,002$	
МДА, ммоль/л				$r=0,46$ $p=0,009$	$r=0,45$ $p=0,01$	$r=0,4$ $p=0,02$	
АОА, ммоль/л	$r=0,43$ $p=0,03$	$r=0,4$ $p=0,019$			$r=0,57$ $p=0,025$		
Окисленный глутатион, мкмоль/л				$r=0,36$ $p=0,031$	$r=0,37$ $p=0,028$		$r=0,37$ $p=0,008$
Тиоредоксин, нг/мл	$r=0,54$ $p=0,023$	$r=0,57$ $p=0,0012$	$r=0,52$ $p=0,015$				
ПК, нмоль/мг		$r=0,64$ $p=0,0002$					
8-ОХДГ, нг/мл				$r=0,53$ $p=0,0012$			

Примечание: сажа, 0,1–1 мкм – сажа в диапазоне размерности частиц от 0,1 до 1 мкм; сажа, 1–2,5 мкм – сажа в диапазоне размерности частиц от 1 до 2,5 мкм; сажа, 2,5–10 мкм – сажа в диапазоне размерности частиц от 2,5 до 10 мкм; металлы, 2,5–10 мкм – металлические частицы в диапазоне размерности от 2,5 до 10 мкм; минералы, 10–100 мкм – минеральные частицы в диапазоне размерности от 10 до 100 мкм; органика, 10–100 мкм – органические частицы в диапазоне размерности от 10 до 100 мкм.

Частицы в диапазоне фракции от 0,1 до 1 мкм, являющиеся по составу сажей, связаны с 3 показателями АМ: АОА ($r=0,4$, $p=0,019$); тиоредоксином ($R=0,57$, $p=0,0012$) и протеин карбонил ($r=0,64$, $p=0,0002$). Фракционный и качественный состав ТВЧ с аэродинамическим диаметром от 1 до 2,5 мкм, представленные сажей, связан с одним клеточным параметром – тиоредоксином ($r=0,52$, $p=0,015$). Обнаружена взаимосвязь 4-х показателей окислительно-восстановительного баланса альвеолярных макрофагов с фракционным составом частиц в диапазоне фракции от 2,5 до 10 мкм: ГПЛ ($r=0,37$, $p=0,027$); МДА ($r=0,39$, $p=0,022$); протеин карбонил ($r=0,62$, $p=0,015$) 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 3 связи – МДА ($r=0,46$, $p=0,009$); окисленный глутатион ($r=0,36$, $p=0,031$) и 8-ОХДГ ($r=0,53$, $p=0,0012$), воздействие металлических частиц связано с образованием МДА ($r=0,45$, $p=0,01$); окисленного глутатиона ($r=0,37$, $p=0,028$) и общей АОА ($r=0,37$, $p=0,028$). На частицы в диапазоне фракции от 10 до 100 мкм ответили 2 показателя: ГПЛ ($r=0,43$, $p=0,014$) и общая АОА ($r=0,36$, $p=0,009$). На минеральные частицы с размерностью от 10 до 100 мкм ответили два клеточных параметра – ГПЛ ($r=0,45$, $p=0,002$) и МДА ($r=0,4$, $p=0,02$) и один показатель АМ – окисленный глутатион ($r=0,37$, $p=0,008$) был связан с частицами в диапазоне фракции от 10 до 100 мкм органического происхождения.

Выявленные корреляционные взаимосвязи между показателями ответной реакции альвеолярных макрофагов на воздействие обеих модельных взвесей, соответствующих загрязнению ТВЧ атмосферного воздуха двух различающихся по техногенной нагрузке районов г. Владивостока, показали зависимость параметров окислительно-восстановительного гомеостаза клетки, как от фракционного, так и от качественного составов. С целью выделения вклада каждой группы факторов в ответную реакцию клетки была рассчитана доля их вклада, результаты представлены в таблице 21.

Таблица 21 – Вклад характеристик модельной взвеси в ответную реакцию показателей АМ в культуре клеток и культуральной среде, %

Показатели	Культура АМ, воздействие модельной взвеси № 1	Культура АМ, воздействие модельной взвеси № 2	Культуральная среда АМ, воздействие модельной взвеси № 1	Культуральная среда АМ, воздействие модельной взвеси № 2
Суммарное r , всего	1,71	9,46	7,41	13,42
Суммарное r качественного состава	1,14	5,78	4,63	7,06
Суммарное r фракционного состава	0,57	3,68	2,78	16,36
Удельный вес качественного состава, %	66,7	61,1	62,5	52,6
Удельный вес фракционного состава, %	33,3	38,9	37,5	47,4

Наибольший вклад внесли качественные характеристики ТВЧ и в культуре альвеолярных макрофагов, и в среде их культивирования при воздействии и модельной взвеси № 1, и модельной взвеси № 2 (удельный вес этих факторов составил от 52,6% до 66,7%). Однако доля вклада фракционного состава ТВЧ, характеризующих загрязнение атмосферного воздуха территории с высоким уровнем техногенной нагрузки выше, чем при воздействии модельной взвеси № 1, как в культуре альвеолярных макрофагов, так и в среде их культивирования (38,9% против 33,3% в культуре клеток, 47,4% против 37,5% в культуральной среде).

Среди всех обнаруженных взаимосвязей параметров окислительно-восстановительного баланса клетки с воздействующим фактором были выделены наиболее значимые связи. Наибольшее число связей характерно для тиоредоксина. В культуре клеток и в культуральной среде АМ, нагруженных модельной взвесью, соответствующей составу ТВЧ атмосферного воздуха территории с высоким уровнем техногенного загрязнения, выявлено по 6 связей со среднеарифметической величиной $r=0,58$ ($p<0,05$) и $r=0,54$ ($p<0,05$) соответственно. В культуральной среде АМ, нагруженных модельной взвесью, характеризующей состав ТВЧ атмосферного воздуха территории с незначительным техногенным прессингом, также выявлено 6 связей со средней величиной $r=0,5$ ($p<0,05$). Полученные данные указывают на значительный вклад тиоредоксина в защиту и восстановление клетки при окислительном стрессе, вызванном воздействием ТВЧ. Характеристикой разрушения белковых структур клетки, нарушающего клеточную проницаемость, функциональную активность как ферментов, так и структуры компартментов и самой клеточной оболочки, является протеин карбонил. Обнаружено 3 статистически значимые связи протеин карбонила с показателями окислительно-восстановительного баланса клетки со средней величиной $r=0,63$ ($p<0,05$) в среде культивирования АМ, подвергнутых воздействию модельной взвеси № 2. В тоже время имеется 4 корреляционные зависимости со средней величиной $r=0,42$ ($p<0,05$) в группе АМ, нагруженных модельной взвесью № 1. Протеин карбонил является ранним

и чувствительным индикатором токсического повреждения белков клетки в результате воздействия ТВЧ. Выявлено 3 взаимосвязи 8-ОХДГ в культуральной среде АМ, подвергнутых воздействию модельной взвеси, характеризующей состав частиц атмосферного воздуха территории с высоким техногенным прессингом, среднеарифметическая величина составила $r=0,63$ ($p<0,05$).

Таким образом, оценка корреляционных зависимостей показателей окислительно-восстановительного баланса клетки от фракционного и качественного составов модельных взвесей показала наибольшее функциональное внутрисистемное напряжение в группе АМ, нагруженных модельной взвесью № 2. В этой группе выявлено наибольшее число корреляционных связей как в культуральной среде, так и в культуре клеток, причем наибольшее число связей обнаружено с ТВЧ размерностью до 10 мкм. При увеличении в модельной взвеси доли мелкодисперсных частиц происходит увеличение вклада фракционного состава ТВЧ. Определены наиболее значимые параметры ответной реакции альвеолярного макрофага на повреждающий фактор. Наибольшее число связей (по 6 связей в трех группах, в одном случае выявлена сильная связь – $r=0,7$ ($p=0,0007$) с частицами в диапазоне фракции от 1 до 2,5 мкм, представленных сажей) выявлено у тиоредоксина, что объясняется его многофункциональной ролью в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза клетки. Наиболее статистически значимая корреляционная связь ($r=0,64$, $p=0,0002$) с диапазоном частиц от 0,1 до 1 мкм, представленных сажей, выявлена у протеин карбонила. Третий показатель, как характеристика повреждения геномного аппарата клетки – это 8-ОХДГ ($r=0,63$, $p=0,0031$ с диапазоном частиц от 2,5 до 10 мкм), определен в культуральной среде АМ, нагруженных модельной взвесью, характеризующей загрязнение ТВЧ атмосферного воздуха территории с высокой техногенной нагрузкой.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Атмосферный воздух является неотъемлемым фактором жизнеобеспечения населения. Последние десятилетия в различных странах мира проводятся исследования влияния загрязненного воздуха на здоровье человека, накоплен значительный массив эпидемиологических и экспериментальных данных [51, 67, 91, 92, 96, 97, 98, 108, 116]. Одним из наиболее опасных компонентов, загрязняющих воздух урбанизированных территорий, являются твердые взвешенные частицы (ТВЧ) [57, 112, 114, 145, 147]. ТВЧ адсорбируют на своей поверхности различные токсичные вещества, проникающие в бронхолегочную систему вместе с ними при вдыхании [152]. Доказано неблагоприятное воздействие ТВЧ на органы дыхания, как здоровых, так и восприимчивых лиц всех возрастов [73, 107, 137, 166], причем наиболее чувствительны – пожилые люди, дети и больные хроническими респираторными и сердечно-сосудистыми заболеваниями [41, 54, 64, 96, 104, 133, 167]. В многочисленных исследованиях зафиксирована взаимосвязь воздействия загрязнения воздушной среды $PM_{2,5}$ с заболеваемостью и смертностью от респираторных заболеваний [145]. Доказано, что развитие и обострение ряда заболеваний, в том числе бронхиальной астмы [67], хронической обструктивной болезни легких [82], фиброза и рака легких [122, 130] связано с воздействием $PM_{2,5}$.

Загрязнение воздушной среды микрочастицами обусловлено как природными процессами, так и техногенными выбросами, источниками которых являются автотранспорт, предприятия энергетики, ряд промышленных производств. Неотъемлемой характеристикой урбанизированных территорий являются уровни загрязнения атмосферного воздуха, формируемые автомагистралями и стационарными источниками загрязнения [55]. Возможны заносы загрязняющих веществ, а также одномоментные выбросы из промышленных источников, которые будут создавать кратковременные высокие

уровни загрязнения. Локальные характеристики местности, такие как рельеф, характер и плотность застройки, климатические особенности региона – все это создает характерное для конкретной территории загрязнение атмосферного воздуха твердыми взвешенными веществами [49, 142, 167]. В литературных источниках имеются указания на территориальные различия состава атмосферных взвесей как между территориями, так и внутри регионов [15]. Непосредственные источники образования твердых взвешенных частиц, поступающих в атмосферный воздух, определяют их элементный и дисперсный состав [132]. Опубликованы данные исследований о различиях в патогенных свойствах ТВЧ, загрязняющих атмосферный воздух различных территорий [64, 97, 105, 123, 124, 126, 146, 157]. Химический состав ТВЧ от различных источников достаточно хорошо изучен [146], и понимание дифференциальной токсичности различных источников микрочастиц имеет огромное значение для разработки эффективных и экономически обоснованных стратегий контроля загрязненности атмосферного воздуха [132].

Однако, относительная токсичность ТВЧ зависит не только от качественного состава, но и от размерности частиц, причем дисперсность, как количественная характеристика, потенцирует действие химических составляющих ТВЧ. Чем мельче частицы, тем глубже они способны проникать в дыхательные пути, таким образом оказывая потенциально более выраженное воздействие [168].

Поскольку размер определяет глубину проникновения ТВЧ в дыхательные пути человека, нами были выделены патофизиологические диапазоны размерности частиц в зависимости от точки осаждения в легких, эффективности элиминации частиц, возможных механизмов воздействия. Непосредственное воздействие начинается в момент оседания ТВЧ на слизистую оболочку различных отделов респираторного тракта. Частицы с размерностью больше 10 мкм оседают на поверхности носовой полости, от 2,5 до 10 мкм – в проводящих дыхательных путях: на слизистой оболочке трахеи и бронхов, где основным механизмом удаления является мукоцилиарный клиренс.

Мелкодисперсные частицы с размерностью до 2,5 мкм при вдыхании могут оседать в нижних дыхательных путях на слизистой оболочке бронхиол и альвеол [139]. В этой области отсутствует реснитчатый эпителий в выстилке воздухоносных путей. Ультратонкие частицы с размерностью менее 0,1 мкм сопоставимы с толщиной плазмалеммы и могут проходить клеточные мембраны, являясь потенциально самыми опасными частицами [56, 85, 89, 116, 118, 151, 161].

В нашем исследовании в соответствии с выделенными патофизиологическими диапазонами размерности частиц были определены уровни загрязнения ТВЧ приземного слоя атмосферного воздуха типичных, характерных для территории города Владивостока, районах с незначительной и высокой техногенной нагрузкой (рисунок 8).

Для формирования модельных взвесей, использованных в экспериментальной части исследования по нагрузке альвеолярных макрофагов, на основании полученных данных о концентрации ТВЧ в приземном слое атмосферного воздуха в двух районах г. Владивостока, был рассчитан дисперсный состав частиц. В модельной взвеси № 1, характеризующей загрязнение ТВЧ в приземном слое атмосферного воздуха района с незначительной нагрузкой, преобладали частицы с размерностью больше 10 мкм (78%), принадлежащие к экстраторакальной и трахеобронхиальной фракциям. Содержание частиц PM_{10} и $PM_{2,5}$, представляющих наибольшую угрозу для клеток, составляло небольшую часть – 4,9%. Модельная взвесь № 2, характеризующая территорию с высоким техногенным прессингом, содержала значительное количество частиц с диаметром до 10 мкм: диапазон фракции до 1 мкм составил 27,8%, частицы в диапазоне мелкодисперсной фракции от 1 до 2,5 мкм – 6,3%, крупнодисперсные частицы в диапазоне фракции 2,5–10 мкм – 36%. В модельной взвеси № 2 доля PM_{10} и $PM_{2,5}$ составила 34,1%. Причем наимельчайшие частицы имели диаметр около 0,01 мкм (10 нм), что чуть больше толщины плазмалеммы. Крупных частиц было немного, их размер не превышал 47,0 мкм.

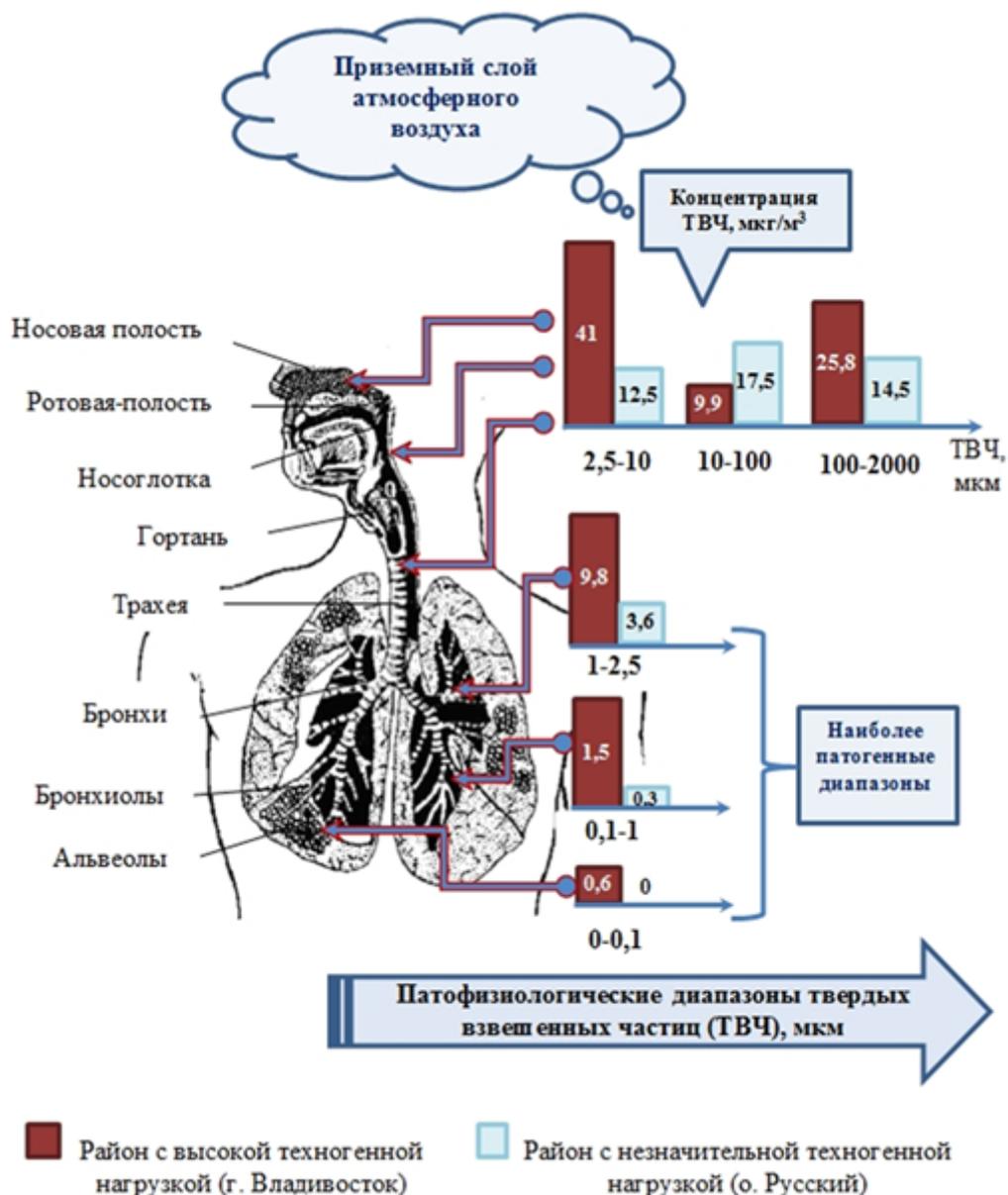


Рисунок 8 – Содержание твердых взвешенных частиц в приземном слое атмосферного воздуха г. Владивостока.

Полученные результаты свидетельствуют о различиях в содержании фракций ТВЧ в зависимости от техногенного прессинга. В атмосферном воздухе урбанизированной территории с высокой техногенной нагрузкой преобладают частицы микроразмерного диапазона, оказывающие наиболее патогенное воздействие на организм человека. Характеристикой загрязнения территории с незначительной техногенной нагрузкой является преобладание грубой фракции ТВЧ с размерностью более 10 мкм.

Также при моделировании взвесей были учтены характеристики качественного состава твёрдых частиц, загрязняющих воздушную среду исследуемых территорий [10, 11, 13]. Для приготовления модельной взвеси ТВЧ обоих районов в качестве основных компонентов были взяты сажа и пепел, минералы, металлы, синтетические и органические вещества. Согласно данным Liang et al. (2016) и Pinault et al. (2016) наличие в атмосферном воздухе ультратонких частиц связано с источниками антропогенных выбросов, а именно двигателями внутреннего сгорания и электростанциями [137, 146], что также характерно для г. Владивостока. Выхлопные газы автомобилей с продуктами неполного сгорания топлива в двигателях внутреннего сгорания содержат очень опасную для здоровья человека сажу, состоящую из частиц углерода. Сажа обладает высоким адсорбционным потенциалом, в том числе в отношении тяжёлых углеводородов, особенно к бенз(а)пирену [121, 158, 163]. Исследования взаимосвязи химического состава и биологической активности с продукцией АФК *in vitro* доказывают окислительные свойства элементарного и органического углерода [125, 150], минеральных природных материалов [90]. На исследованных территориях города Владивостока источником образования частиц грубой фракции PM_{10} (от 2,5 до 10 мкм) могут быть как природные процессы, так и техногенные выбросы [27, 46]. Наиболее представлены в воздушной среде г. Владивостока такие микрочастицы металлов, как оксиды железа и свинца, присутствующие в естественной среде, однако особенно высокой токсичностью обладают такие частицы, образованные в результате износа тормозов и шин в размерности грубодисперсной фракции [20, 156]. Неоднократно в работах исследователей была показана активность металлических компонентов микрочастиц [125, 143, 144, 150].

Отсутствие качественных различий между взвесями в диапазоне размерности фракции до 2,5 мкм, являющихся наиболее фагоцитируемыми частицами, позволило рассматривать полученные результаты в контексте приоритетности влияния различий в дисперсном составе этих частиц. В экспериментальном исследовании на альвеолярных макрофагах крыс линии

Вистар изучены особенности комплексной ответной реакции клеток на воздействие смоделированных взвесей, идентичных по составу ТВЧ, загрязняющих атмосферный воздух «в зоне дыхания» двух районов г. Владивостока с различной степенью техногенной нагрузки. Исследований подобного дизайна в доступных источниках литературы обнаружено не было.

В результате проведенного корреляционного анализа определены основные тенденции в ответной реакции клетки на воздействие модельных взвесей ТВЧ. Анализ корреляционных связей показателей ответной реакции альвеолярных макрофагов с характеристиками модельных взвесей ТВЧ показал зависимость окислительно-восстановительного гомеостаза клетки как от качественного, так и дисперсного составов. Для определения вклада каждой группы факторов в ответную реакцию клетки был рассчитан их удельный вес. Качественные характеристики ТВЧ внесли большой вклад и в культуре клеток, и в культуральной среде при нагрузке обеими модельными взвесями, доля этих факторов составила от 52,6% до 66,7%. Тем не менее, доля вклада дисперсного состава ТВЧ, характеризующих загрязнение атмосферного воздуха на территории с высокой техногенной нагрузкой, выше, чем при воздействии модельной взвеси № 1, как в культуре клеток (38,9% против 33,3%), так и в культуральной среде (47,4% против 37,5%) альвеолярных макрофагов. Таким образом, при увеличении в модельной взвеси доли мелкодисперсных частиц происходит увеличение вклада дисперсного состава ТВЧ.

Интегральный внутрисистемный отклик параметров окислительно-восстановительного гомеостаза в опытных группах альвеолярных макрофагов характеризуется усилением внутрисистемной напряженности в сравнении с интактной группой, причем наибольшее напряжение наблюдается в результате воздействия модельной взвеси ТВЧ, представленной в большей степени мелкодисперсными фракциями. Мощность интегральных внутрисистемных связей показателей окислительно-восстановительного баланса в культуре клеток, нагруженных модельной взвесью № 1, выше показателя интактной группы в 4,8 раза, в то время как в культуре альвеолярных макрофагов,

подвергнутых воздействию модельной взвеси № 2 – выше значений контрольной группы в 8,2 раза и в 1,7 раза, чем во 2-ой группе. Ответная реакция со стороны показателей культуральной среды более выражена, чем интегральный отклик параметров самих альвеолярных макрофагов. В наибольшей степени прореагировала культуральная среда группы клеток, нагруженных модельной взвесью № 2: показатель выше в 9,3 раза, чем в группе контроля и в 1,8 раза, чем во 2-ой группе. Таким образом, полученная внутрисистемная реакция клеток на воздействие модельных взвесей характеризует функциональное напряжение окислительно-восстановительного гомеостаза, причем развитием более выраженного дисбаланса характеризуется клеточная культура, подвергнутая воздействию модельной взвеси № 2, представленной в большей степени частицами фагоцитируемых фракций. По нашему мнению, наличие значительного количества не фагоцитированных альвеолярными макрофагами ТВЧ мелкодисперсных фракций в культуральной среде 3-ей группы также ведет к значительному увеличению функциональной напряженности клеток.

Рассматривая развитие окислительно-восстановительного дисбаланса в альвеолярных макрофагах при воздействии ТВЧ различной дисперсности, нами были изучены патофизиологические механизмы данного нарушения функциональной активности клеток. После ингаляции твердые взвешенные частицы могут длительное время оставаться в дыхательных путях, способствовать повышенному образованию активных форм кислорода, агрессивных к биологически важным биомолекулам, и как следствие, смещение окислительно-восстановительного баланса клетки в сторону окислителей [53, 72, 106, 123, 150]. В качестве маркеров активности окислительного стресса в эксперименте *in vitro* мы оценили продукты, образующиеся в процессе деструкции биомолекул.

Окисление липидов представляет собой динамический процесс, в котором образование ГПЛ характеризует начальную стадию окислительной модификации липидных составляющих биомолекул, в то время как МДА

является конечным продуктом этих превращений. Оценка обоих показателей позволяет охарактеризовать изменение окислительного повреждения липидов во времени.

Сравнение содержания ГПЛ в группах, подвергнутых воздействию ТВЧ, с интактной группой и между собой позволило дать характеристику начального этапа перекисного окисления липидных структур альвеолярных макрофагов. Отсутствие статистически значимых различий в концентрации ГПЛ в культуре альвеолярных макрофагов 2-ой группы и среде их культивирования от группы контроля свидетельствует о том, что входящие в состав модельной взвеси № 1 микрочастицы не оказывают ярко выраженного воздействия на клетки. Причиной этому явилось преобладание в модельной взвеси № 1 частиц с размерностью от 10 до 140 мкм (78% от общей массы взвеси), которые не могут быть поглощены альвеолярными макрофагами (таблица 1, рисунок 5А). Однако, в результате поглощения альвеолярными макрофагами незначительного количества (4,9% от общей массы модельной взвеси № 1) мелкодисперсных частиц в диапазоне фракции до 2,5 мкм, в культуре клеток 2-ой группы наблюдалось повышение уровня МДА на 23% в сравнении с уровнем контроля. Вследствие разрушения части нагруженных ТВЧ клеток, произошло увеличение концентрации МДА на 21% и в среде культивирования 2-ой группы, что подтверждает патогенность частиц фагоцитируемых фракций.

Увеличение уровня ГПЛ в 1,5 раза в культуре клеток 3-ей группы по сравнению с интактной группой объясняется поглощением альвеолярными макрофагами большего количества твердых взвешенных частиц микроразмерного диапазона. В модельной взвеси № 2 содержание РМ₁₀ составляло около двух третей (70% от общей массы), из которых фагоцитозу поддаются более трети (РМ_{2,5} – 34%) (таблица 2, рисунок 5Б). Корреляционный анализ показал зависимость средней силы ($r=0,41$) образования ГПЛ от поглощения твердых взвешенных частиц в диапазоне 1–2,5 мкм в культуре альвеолярных макрофагов 3-ей группы. Такое увеличение концентрации первичных продуктов пероксидации липидов в альвеолярных макрофагах 3-ей

группы свидетельствует о более выраженных окислительных процессах в результате воздействия на клетки микрочастиц модельной взвеси № 2. Увеличение концентрации МДА в альвеолярных макрофагах 3-ей группы (по сравнению с контрольной группой на 80%, а по сравнению со 2-ой группой – на 46%) подтверждает интенсификацию процессов ПОЛ внутри клетки. Повышение уровня МДА (выше на 60% значений контрольной группы и на 33% по отношению ко 2-ой группе) в культуральной среде 3-ей группы, а также выявленная при корреляционном анализе средняя по силе зависимость уровня ГПЛ ($r=0,37$) и МДА ($r=0,39$) от содержания твердых микрочастиц в диапазоне фракции от 2,5 до 10 мкм свидетельствует о более выраженных окислительных свойствах ТВЧ модельной взвеси № 2. Такая динамика окислительной модификации липидов в 3-ей группе альвеолярных макрофагов, нагруженных модельной взвесью № 2, характеризующей состав ТВЧ атмосферного воздуха территории с высоким уровнем техногенного прессинга, может быть обусловлена выраженным окислительным повреждением мембранных структур, разрушением части клеток, поглотивших значительное количество частиц в диапазоне фракции до 2,5 мкм, преобладающих практически в 7 раз в данной модельной взвеси, и обнаружением клеточного содержимого в культуральной среде.

Общей характеристикой течения перекисного окисления липидов является суммарное содержание продуктов, содержащихся и в культуре клеток, и в культуральной среде. По уровню ГПЛ 1-ая и 2-ая группы не отличаются между собой, однако суммарно концентрация МДА во 2-ой группе выше по отношению к интактной группе на 21,9%, что говорит о незначительной интенсивности протекания процессов окисления. В то же время суммарное содержание ГПЛ в 3-ей группе статистически значимо выше на 38% по сравнению со 2-ой группой. Суммарное содержание МДА в 3-ей группе на 70% превышает значение интактной группы и на 39,5% – уровень 2-ой группы. По нашему мнению, это подтверждает, что входящие в состав модельной взвеси № 2 и представляющие собой смесь преимущественно мелкодисперсных

фракций (0–0,1, 0,1–1, 1–2,5 мкм) твердые частицы обладают более выраженным прооксидантным эффектом, что и приводит к увеличению образования МДА.

Таким образом, в группах клеток, подвергнутых воздействию модельных взвесей, увеличение концентрации МДА, как в культуре альвеолярных макрофагов, так и в среде культивирования, свидетельствует об интенсификации процессов ПОЛ. Наши результаты согласуются с полученными в ряде зарубежных работ данными, где также под воздействием микрочастиц атмосферного воздуха отмечается увеличение содержания параметров, характеризующих процессы пероксидации [53, 123, 127, 150]. По нашему мнению, так как уровень окислительных процессов наиболее выражен при нагрузке модельной взвесью № 2, содержащей большее количество частиц дисперсностью до 2,5 мкм, то при уменьшении аэродинамического диаметра воздействующих частиц происходит интенсификация окислительного стресса.

Наряду с липидами, белки являются компонентами большинства биологических систем и оказываются основными мишенями в условиях окислительного стресса, поскольку быстро реагируют с окислителями и очень чувствительны к окислительному повреждению. Окислительная модификация может привести к повышенной гидрофильности, фрагментации, агрегации, разворачиванию и изменению как конформации белка, так и взаимодействия с биологическими партнерами и измененному обороту в клетке [80]. В свою очередь, перекиси белка могут окислять и белки, и другие мишени. Основной реакцией является прямое окисление цистеина и (реже) остатков метионина и обычно это происходит быстрее, чем с перекисью водорода, что приводит к изменению функциональной активности белка. Перекиси белка в отличие от перекиси водорода удаляются очень медленно, подвергаясь в последующем катаболизму. В то же время, стимуляция свободнорадикальных процессов вызывает усиление генерации эндогенных альдегидов и, как следствие этого, возникновение карбонильного стресса. МДА, как один из наиболее распространенных альдегидов, образующихся в результате перекисного

48 окисления, индуцирует процесс карбонилирования. Это может способствовать накоплению модифицированных белков в клетках и обнаружению их [100] во внеклеточной среде вследствие нарушения целостности клеточной оболочки. Полученные в эксперименте результаты подтверждаются данными клинических исследований [43, 106]. Таким образом, увеличение образования АФК в результате воздействия ТВЧ атмосферного воздуха и одновременно повышение образования продуктов перекисидации может приводить к необратимой окислительной модификации белков – карбонилированию.

В нашем исследовании содержание протеин карбонила в культуральной среде 2-ой группы выше контроля в 1,6 раза, причем обнаружена корреляционная зависимость средней силы между образованием протеин карбонила и воздействием ТВЧ в диапазоне фракции от 1 до 2,5 мкм. Наибольшее увеличение содержания продуктов перекисидации белков выявлено в 3-ей группе, протеин карбонил увеличен в 2,5 раза по отношению к контролю и на 54% по сравнению со 2-ой группой. Выявленная корреляционная связь средней силы между протеин карбонилом и частицами в диапазоне фракции от 0,1 до 1 мкм ($r=0,64$) и от 2,5 до 10 мкм ($r=0,62$) также указывает на прооксидантный эффект мелкодисперсных ТВЧ.

Мы считаем, что исследование уровня протеин карбонила, как характеристики необратимых изменений белков клетки, может быть использовано в качестве чувствительного биоиндикатора токсического повреждения альвеолярных макрофагов в результате воздействия ТВЧ атмосферного воздуха. 8 9 10 Наиболее выраженная окислительная модификация белков обнаружена в группе альвеолярных макрофагов, нагруженных модельной взвесью № 2, имеющей в своем составе большую долю частиц мелкодисперсных фракций, в наибольшей степени способствующих окислительному повреждению клетки.

Интенсификация окислительного повреждения и сдвиг окислительно-восстановительного баланса клетки в сторону окислителей приводит к повреждению генетического материала клетки путем модификации ДНК. Этому

также способствует образующийся в процессе перекисного окисления липидов МДА. В результате окислительной деструкции ДНК активными формами кислорода образуется 8-гидрокси-2'-деоксигуанозин (8-ОХДГ). В нашем исследовании анализ содержания 8-ОХДГ в культуральной среде показал, что наиболее выраженному окислительному повреждению подверглись альвеолярные макрофаги 3-ей группы, подвергнутые воздействию модельной взвеси № 2, характеризующей территорию города с высоким техногенным прессингом. Что подтверждается увеличением концентрации 8-ОХДГ в 2 раза относительно значений контрольной группы и на 20% по отношению ко 2-ой группе. В то время как при воздействии модельной взвеси № 1, соответствующей району города с незначительной техногенной нагрузкой, содержание 8-ОХДГ в культуральной жидкости 2-ой группы увеличилось лишь на 67% относительно значений интактной группы. Так же обнаружена взаимосвязь средней силы ($r=0,63$) с дисперсным составом частиц в диапазоне фракции от 2,5 до 10 мкм. Образование 8-ОХДГ свидетельствует об интенсификации окислительного стресса, приводящей к повреждению уже генетических структур клетки, причем значительное увеличение уровня этого показателя наблюдается при воздействии модельной взвеси № 2, характеризующейся преобладанием мелкодисперсных фракций ТВЧ. Полученные результаты согласуются с клиническими исследованиями, в которых, вследствие воздействия загрязняющих атмосферный воздух мелкодисперсных частиц, был выявлен аналогичный характер нарушений, свидетельствующих о развитии окислительно-восстановительного дисбаланса [106]. По-нашему мнению, определение 8-ОХДГ может быть использовано в качестве маркера токсического повреждения генетического материала альвеолярных макрофагов, опосредуемого развитием окислительного стресса в результате воздействия мелкодисперсных фракций ТВЧ. Наше исследование подтверждает ряд сообщений о различии окислительных свойств микрочастиц атмосферного воздуха, как между территориями, так и внутри регионов [124, 126, 157].

Интенсификация окислительных процессов, наблюдаемая в подвергнутых нагрузке ТВЧ группах альвеолярных макрофагов, приводит к образованию значительного количества конечных метаболитов, что, в свою очередь, дестабилизирует и разрушает клетку [53, 150]. Клеточный окислительно-прооксидантный баланс формируется в значительной мере системой антиоксидантной защиты, вступающей в реакцию с пероксидативными продуктами [127]. Компоненты АОС в норме всегда присутствуют в цитоплазме клеток, во внеклеточном матриксе и в тканевой жидкости. Повышение их уровня свидетельствует об увеличении количества свободных радикалов, что и происходит в присутствии частиц мелкодисперсных фракций. Генерацию АФК, и других радикалов, клетка стабилизирует за счет активного синтеза антиоксидантных веществ.

В нашем исследовании в культуре клеток наблюдаются статистически значимые отличия в содержании общей АОА между тремя группами, что свидетельствует об изменении окислительно-восстановительного баланса. Наличие частиц мелкодисперсных фракций, подвергающихся фагоцитозу, в обеих модельных взвесьях усиливает ответную реакцию в клетках со стороны АОС, что можно видеть по увеличению показателя общей АОА. Наибольшее увеличение общей АОА наблюдалось в 3-ей группе альвеолярных макрофагов – в 2,7 раза по отношению к группе контроля и в 2,1 раза относительно значений 2-ой группы. В среде культивирования различия в концентрации аналогичны: в 3-ей группе общая АОА увеличена на 92% в сравнении с 1-ой группой и относительно 2-ой группы – на 54%. Более выраженная активность АОС во внеклеточной среде 3-ей группы альвеолярных макрофагов подтверждает интенсификацию окислительного стресса в клетках и образование под воздействием микрочастиц модельной взвеси № 2 высоко реакционноспособных соединений.

Аналогичные изменения окислительно-восстановительного гомеостаза выявлены при анализе показателя суммарного содержания общей АОА для культуры клеток и культуральной среды. Фагоцитирование даже небольшого

количества частиц мелкодисперсных фракций (4,9% от общей массы модельной взвеси № 1) косвенно приводит к активации антиоксидантных ферментов клетки, о чем свидетельствует повышение показателя общей активности антиоксидантной системы во 2-ой группе альвеолярных макрофагов на 27% в сравнении с группой контроля. В случае воздействия ТВЧ модельной взвеси № 2, большее компенсаторное увеличение общей АОА (в 3-ей группе уровень общей АОА превышает значения группы контроля в 2,3 раза и на 78% – концентрацию во 2-ой группе) подтверждает прооксидантный эффект мелкодисперсных твердых частиц. Эта зависимость окислительно-восстановительного баланса от количества фагоцитированных частиц также доказывается выявленной корреляционной связью средней силы содержания общей АОА с фракциями ультратонких частиц от 0 до 0,1 мкм ($r=0,43$) и частиц с размерностью от 0,1 до 1 мкм ($r=0,4$).

Таким образом, компенсаторное повышение содержания компонентов АОС говорит об увеличении количества АФК и свободных радикалов. Наличие частиц мелкодисперсных фракций обеих модельных взвесей в клетках усиливало ответную реакцию со стороны АОС, однако наибольшее увеличение показателя общей АОА наблюдалось при воздействии модельной взвеси № 2, содержащей большую долю мелкодисперсных частиц фагоцитируемых фракций.

Функционально значимой составляющей АОС является тиол-дисульфидное звено, включающее в себя системы глутатиона и тиоредоксина, согласованно работающие в условиях окислительного стресса [117]. Изучение содержания показателей глутатионового звена позволяет определить, насколько эффективно антиоксидантная система справляется с постоянно образующимися под воздействием мелкодисперсных ТВЧ высоко реакционноспособными соединениями [53]. Восстановленный глутатион распространен во всех клеточных компартментах, занимая важное место в системе АОЗ [18]. Восстановленный глутатион проявляет свои антиоксидантные эффекты несколькими способами. Он детоксифицирует перекись водорода и перекиси

липидов посредством действия глутатионпероксидазы. Восстановленный глутатион отдает свой электрон H_2O_2 , чтобы восстановить его до H_2O и O_2 . Окисленный глутатион снова превращается в восстановленную форму при помощи глутатионредуктазы. [75]. С участием глутатионпероксидазы протоны восстановленного глутатиона переходят к мембранным липидам, защищая их от воздействия окислителей. Также глутатион вносит значительный вклад в поддержание нормального энергетического состояния клетки [106]. Путем обратимого S-глутатионилирования глутатион влияет на функции редокс-чувствительных белков, вызывая структурные и функциональные изменения [86, 127].

В нашем исследовании в культуре альвеолярных макрофагов уровень окисленного глутатиона в группах, подвергнутых воздействию модельных взвесей, отличается от содержания в контрольной группе, в то время как между 2-ой и 3-ей группами статистически значимых различий не выявлено. 36 Повышение в 2 раза уровня окисленного глутатиона в опытных группах относительно значений группы контроля, по нашему мнению, свидетельствует об интенсификации ПОЛ и достаточно высокой активности глутатионпероксидазы, приводящей к образованию окисленного глутатиона. В группе альвеолярных макрофагов, нагруженных модельной взвесью № 2, обнаружена взаимосвязь средней силы содержания в культуре клеток окисленного глутатиона с частицами в диапазоне фракции от 1 до 2,5 мкм ($r=0,38$) и в диапазоне фракции от 2,5 до 10 мкм ($r=0,39$), что свидетельствует о большем окислительном потенциале частиц данной размерности, входящих в эту модельную взвесь. В то же время, концентрация восстановленного глутатиона в культурах альвеолярных макрофагов и 2-ой, и 3-ей групп не различается, что указывает на способность макрофагов за счет действия глутатионредуктазы частично восстанавливать окисленный глутатион и поддерживать окислительно-восстановительный баланс клеток. Следовательно, повышение уровня окисленного глутатиона в культуре альвеолярных макрофагов 2-ой и 3-ей групп является следствием усиленной детоксикации

избыточного количества гидропероксидов и косвенным признаком усиления пероксидации липидов.

В культуральной среде содержание окисленного глутатиона в группах сравнения не различается, так как альвеолярные макрофаги не осуществляют его экзоцитоз. Одновременно с этим для восстановленного глутатиона выявлена обратная картина: по сравнению с интактной группой во 2-ой группе концентрация снижена на 32,5%, а в 3-ей группе – на 39,5%. Для общего глутатиона характерно снижение: во 2-ой группе уровень ниже на 42% и в 3-ей группе – на 31% по отношению к контрольной. Уменьшение концентрации в среде культивирования общего и восстановленного глутатиона во 2-ой и 3-ей группах в сравнении с интактной группой, как мы считаем, связано со снижением экзоцитоза восстановленного глутатиона, поскольку он в большей степени нужен внутри клетки для антиоксидантной защиты.

Суммарное содержание глутатиона во 2-ой группе не имеет различий с контрольной группой, что говорит о сбалансированном функционировании системы восстановления глутатиона. В то же время, в 3-ей группе альвеолярных макрофагов выявлены отличия от группы контроля: наблюдается снижение уровня общего и восстановленного глутатиона (на 21% и 30%, соответственно), содержание окисленного глутатиона возрастает на 42%. Уменьшение концентрации общего и восстановленного глутатиона и повышение содержания окисленного глутатиона связано с увеличением концентрации гидроперекисей липидов при нагрузке модельной взвесью № 2, содержащей значительное количество мелкодисперсных частиц.

Нагрузка твердыми взвешенными частицами модельной взвеси № 2 приводит к повышению концентрации окисленного глутатиона в культуре альвеолярных макрофагов, при этом снижается уровень восстановленного глутатиона в культуральной среде. Микрочастицы модельной взвеси № 1 также повышают содержание окисленного глутатиона в культуре макрофагов, однако уровень восстановленного глутатиона остается в пределах нормы и в культуре клеток, и в среде культивирования. Наши результаты согласуются с

результатами экспериментального исследования Aztatzí-Aguilar et al. (2018) об активации глутатионового звена при воздействии микроразмерных частиц. Было показано, что в легких на антиоксидантный ответ оказывает влияние фракционный состав ТВЧ [94].

При изучении тиоредоксиновой системы антиоксидантной защиты были получены следующие результаты. В культуре клеток уровень тиоредоксина увеличен относительно группы контроля (для 2-ой группы на 65%, а для 3-ей группы – в 2 раза) и не имеет различий в содержании тиоредоксина в сравниваемых группах альвеолярных макрофагов, подвергнутых воздействию. Обнаружена сильная корреляционная связь между уровнем тиоредоксина в культуре клеток 3-й группы и содержанием частиц в диапазоне фракции от 1 до 2,5 мкм ($r=0,77$) и средней силы с диаметром от 0,1 до 1 мкм ($r=0,5$) и от 2,5 до 10 мкм ($r=0,6$).

Повышение уровня тиоредоксина в опытных группах в ответ на усиление протекания окислительных внутриклеточных реакций в результате фагоцитоза мелкодисперсных частиц, свидетельствует о вовлечении в процесс пероксидации как липидных, так и белковых структур клетки, в том числе генетического материала АМ. В значительной степени от активности тиоредоксиновой АОС зависит снижение уровня окислительного повреждения белков за счет восстановления дисульфидных связей. Также тиоредоксин осуществляет восстановление ключевых ферментов, обеспечивающих синтез ДНК. Защита структуры ДНК обеспечивается путем поддержания клеточного редокс-потенциала, передачи сигнала другим участникам АОЗ, тиоредоксин принимает участие в репарации окислительных повреждений ДНК. Тиоредоксин контролирует активность и функционирование сигнальных белков. Оксидативный стресс приводит к диссоциации комплекса тиоредоксина с апоптоз-сигнальной киназой-1, что приводит к ее активации, индуцируя апоптотический сигнальный каскад. В активации NF- κ B, регулирующего апоптоз, клеточный цикл и иммунный ответ, задействован цитозольный тиоредоксин.

Немаловажными являются и функции тиоредоксина во внеклеточной среде. В нашем исследовании содержание тиоредоксина в культуральной среде всех трех групп выше, чем в культуре клеток. Здесь же наблюдаются и более сильные различия в содержании тиоредоксина по группам. Во 2-ой группе уровень тиоредоксина выше, чем в первой, в 9 раз. Тиоредоксин отреагировал на воздействие ТВЧ с размерностью от 0,1 до 1 мкм ($r=0,37$) и от 1 до 2,5 мкм ($r=0,6$). Для 3-ей группы уровень тиоредоксина в 13 раз превышает уровень контроля и на 44% уровень 2-ой группы. Выявлена корреляционная связь тиоредоксина с фракцией ультратонких частиц (0–0,1 мкм) ($r=0,54$), частицами в диапазоне фракции от 0,1 до 1 мкм ($r=0,57$) и от 1 до 2,5 мкм ($r=0,52$). Обнаружение тиоредоксина в культуральной среде, скорее всего, связано с активным синтезом тиоредоксина альвеолярными макрофагами и его экзоцитозом во внешнюю среду. Более значительное увеличение тиоредоксина в группе альвеолярных макрофагов, подвергнутых воздействию модельной взвеси № 2, связано с большим количеством мелкодисперсных частиц, которые еще не фагоцитированы клетками. Тиоредоксин является фактором хемотаксиса, к тому же он препятствует запуску апоптоза в клетках, который способен активироваться от огромного количества разнообразных факторов, включая АФК.

В клинических исследованиях по оценке влияния микроразмерных частиц на жителей урбанизированной территории наблюдаются аналогичные тенденции [106]. Воздействие микротоксикантов воздушной среды на здоровых жителей экологически неблагоприятного района г. Владивостока приводит к формированию окислительных модификаций ДНК, белковых и липидных структур и нарушению энергетического потенциала иммунокомпетентных клеток. В свою очередь, система антиоксидантной защиты реагировала возрастом как общей активности, так и увеличением уровня параметров тиолдисульфидной системы.

Триггерным механизмом воздействия микроразмерных твердых частиц является опосредованный активными формами кислорода оксидантный стресс, нарушающий проницаемость клетки (рисунок 9).

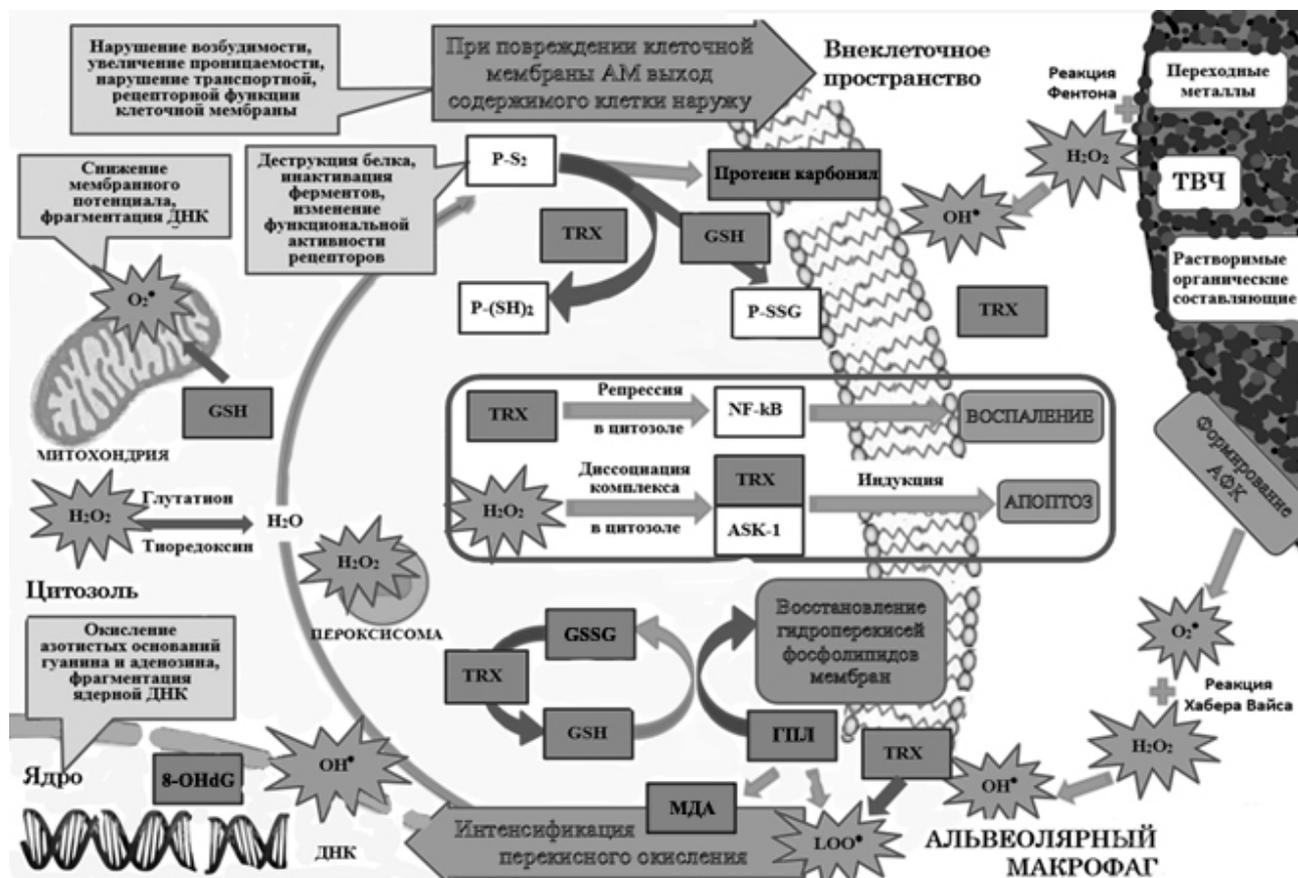


Рисунок 9 – Патофизиологические механизмы нарушения окислительно-восстановительных процессов в АМ крыс линии Вистар.

Примечание: ГПЛ – гидроперекиси липидов, МДА – малоновый диальдегид, ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота, ТВЧ – твердые взвешенные частицы TRX – тиоредоксин, P-S₂ – белок в окисленной форме, P-(SH)₂ – белок в восстановленной форме, P-SSG – белок в глутатионилированной форме, ASK-1 – apoptosis-regulating kinase-1, NF-κB – nuclear factor kappaB, H₂O₂ – пероксид водорода, GSH – глутатион в окисленной форме, GSSG – глутатион в восстановленной форме, 8-OHdG – 8-гидрокси-2'-деоксигуанозин, LOO• – липопероксильный радикал O₂• – супероксидный анион-радикал, HO• – гидроксильный радикал.

Главным свободным радикалом в легких является пероксид водорода (H₂O₂). После взаимодействия ТВЧ с пероксидом водорода в реакции Фентона образуются высоко реакционноспособные гидроксильные радикалы. Также к

образованию гидроксильных радикалов в реакции Хабера-Вайса может приводить супероксид, произведённый частицами с размерностью менее 2,5 мкм. Наряду с этим сами альвеолярные макрофаги генерируют окислители в процессе фагоцитоза мелкодисперсных частиц, а также возможна утечка супероксида в результате разрушения матрикса митохондрий. Возрастание продуктов пероксидации обусловлено тем, что ТВЧ в диапазоне до 1 мкм и от 1 до 2,5 мкм увеличивает содержание свободных радикалов и активных форм кислорода, приводя к интенсификации окислительных реакций.

Таким образом, в результате воздействия модельной взвеси № 1 с меньшим удельным весом частиц размерностью до 2,5 мкм (в 6,9 раза), АОС справлялась с высоко реакционноспособными соединениями и сохраняла окислительно-восстановительный баланс внутри клетки на физиологическом уровне, локализуя возникшую деструкцию внутри клетки. Модельная взвесь № 2 вызывала большее смещение окислительно-восстановительного баланса в сторону окислителей. Таким образом, при увеличении содержания (или более длительном стресс-индуцирующем воздействии) $PM_{2,5}$ происходит интенсификация окислительного стресса и возможна генерализация процесса деструкции с выходом продуктов во внеклеточное пространство. Истощение резервных возможностей АОС и переход процессов деструкции на системный уровень будет способствовать развитию предпосылок для формирования экологозависимой патологии органов дыхания.

Заключение

При изучении протекающих процессов окисления и восстановления внутри клетки и среде культивирования были выявлены особенности ответной реакции основных триггерных систем альвеолярных макрофагов экспериментальных животных на воздействие ТВЧ различной дисперсности. Оценка интегральных взаимоотношений внутрисистемных корреляционных связей показала наибольшее функциональное внутрисистемное напряжение в группе альвеолярных макрофагов, нагруженных модельной взвесью № 2. В этой

группе выявлено наибольшее число корреляционных связей как в культуральной среде, так и в культуре клеток, причем наибольшее число связей обнаружено с ТВЧ в диапазоне фракции от 0 до 10 мкм. Анализ зависимостей показателей окислительно-восстановительного баланса клетки от дисперсного и качественного составов модельных взвесей показал, что при увеличении в модельной взвеси доли мелкодисперсных частиц происходит увеличение вклада фракционного состава ТВЧ. Обобщив результаты проведенных исследований, мы пришли к выводу, что ответная реакция клетки обусловлена содержанием в модельных взвесах частиц, фагоцитируемых альвеолярными макрофагами и способных усиливать выработку АФК. Усиление процессов перекисного окисления в АМ формируется как ответная реакция на увеличение в модельных взвесах доли высоко патогенных фракций.

Определены наиболее значимые параметры ответной реакции альвеолярного макрофага на повреждающий фактор. Тиолдисульфид-опосредуемые защитные механизмы оказывают значительное влияние в процессах, направленных на нивелирование окислительного стресса, вызванного воздействием микроразмерных взвесей атмосферного воздуха, в альвеолярных макрофагах. Анализ содержания основных компонентов тиолдисульфидного звена антиоксидантной системы показал, что в ответ на воздействие частиц модельных взвесей, характеризующих атмосферное загрязнение обоих районов, происходит повышение содержания окисленного глутатиона в культуре клеток, что косвенно подтверждает прооксидантное действие ТВЧ. Однако, наибольшее число связей (по 6 связей в трех группах, в одном случае выявлена сильная связь – $r=0,7$ с частицами в диапазоне фракции от 1 до 2,5 мкм) выявлено у тиоредоксина, что объясняется его многофункциональной ролью в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза клетки. Влияние частиц обеих взвесей затрагивает синтез тиоредоксина, участвующего в восстановлении окисленных белков, в том числе глутатиона, репарации ДНК и хемотаксисе макрофагов, значительно увеличивая его концентрацию в культуральной среде. Происходит усиление синтеза

тиоредоксина, необходимого для взаимодействия с сигнальными белками и инактивирующего запуск апоптоза в альвеолярных макрофагах.

Характеристикой разрушения белковых структур клетки, нарушающего клеточную проницаемость, функциональную активность как ферментов, так и структуры компартментов и самой клеточной оболочки, является протеин карбонил. У протеин карбонила выявлена наиболее статистически значимая корреляционная связь ($r=0,64$) с диапазоном частиц от 0,1 до 1 мкм, что характеризует данный диапазон как наиболее патогенный.

Показатель, являющийся характеристикой повреждения геномного аппарата клетки – это 8-ОХДГ. В культуральной среде АМ, нагруженных модельной взвесью, характеризующей состав частиц атмосферного воздуха территории с высоким техногенным прессингом выявлена корреляционная связь средней силы ($r=0,63$) 8-ОХДГ с диапазоном частиц от 2,5 до 10 мкм. Содержание протеин карбонила и 8-ОХДГ в группах альвеолярных макрофагов, подвергнутых воздействию модельных взвесей, свидетельствует об интенсификации процессов перекисного окисления, что может служить маркером раннего повреждения клетки, опосредованного развитием окислительного стресса в результате воздействия ТВЧ воздушной среды.

Таким образом, более длительное стресс-индуцирующее воздействие ТВЧ мелкодисперсных фракций в диапазоне до 2,5 мкм, а также при увеличении уровня их концентрации в приземном слое атмосферного воздуха, окислительно-проокислительный баланс АМ может сдвигаться в сторону развития окислительного стресса и обуславливать истощение резервных возможностей АОС с переходом процессов деструкции на системный уровень. Это будет способствовать развитию предпосылок для формирования и прогрессирования патологических нарушений.

ВЫВОДЫ

1. Установлено содержание ТВЧ приземного слоя атмосферного воздуха в патофизиологических диапазонах размерности частиц, выделенных в зависимости от точки осаждения ТВЧ в организме, эффективности элиминации частиц, возможных механизмов воздействия. В атмосферном воздухе урбанизированной территории с высокой техногенной нагрузкой содержится значительное количество частиц PM_{10} и $PM_{2.5}$, оказывающих наиболее патогенное воздействие на организм человека. Характеристикой загрязнения территории с незначительной техногенной нагрузкой является преобладание фракции с размерностью более 10 мкм.

2. Выраженную окислительную модификацию липидных, белковых и генетических структур макрофагов БАЛ и развитие окислительного стресса вызывает воздействие мелкодисперсных ТВЧ модельной взвеси, характеризующей состав частиц воздушной среды территории с высоким техногенным прессингом.

3. Интенсивность отклика параметров окислительно-восстановительного гомеостаза АМ зависит от качественного состава и количества фагоцитируемых альвеолярными макрофагами мелкодисперсных частиц, индуцирующих продукцию АФК и свободных радикалов в клетках. При увеличении количества мелкодисперсных частиц фагоцитируемых фракций происходит увеличение вклада дисперсного состава ТВЧ в ответную реакцию системы «перекисное окисление – антиоксидантная защита».

4. Наиболее значимым участником тиолдисульфидзависимых антиоксидантных процессов является тиоредоксин, играющий ключевую (многокомпонентную) роль в протекции клеток от микротоксикантов за счет репаративного действия и участвующий в редокс-регуляции, предотвращении апоптоза и хемотаксисе макрофагов.

5. Содержание протеин карбонила и 8-гидрокси-2'-деоксигуанозина, свидетельствующих о необратимых окислительных модификациях белковых и нуклеиновых клеточных структур, могут использоваться как чувствительные биоиндикаторы токсического повреждения клетки от воздействия мелкодисперсных фракций твердых частиц, взвешенных в атмосферном воздухе.