

Голохваст Кирилл Сергеевич

**Реакция организмов на действие природных
атмосферных взвесей**
(экспериментальное исследование)

03.02.08 – экология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Владивосток – 2011

Работа выполнена на кафедре охраны окружающей среды Института нефти и газа Дальневосточного государственного технического университета (ДВПИ им. В.В. Куйбышева) и кафедре общей экологии Дальневосточного федерального университета.

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор,
заслуженный деятель науки РФ
Христофорова Надежда Константиновна

Официальные оппоненты: академик РАН, доктор медицинских наук,
профессор
Бородин Юрий Иванович

доктор биологических наук, профессор
Бузолёва Любовь Степановна

доктор медицинских наук, профессор
Петров Владимир Александрович

Ведущая организация: Тихоокеанский институт географии
ДВО РАН, г. Владивосток

Защита состоится «21» мая 2011 г. в 10:00 на заседании диссертационного совета Д 212.056.02 при Дальневосточном федеральном университете МОН РФ по адресу: 690091, г. Владивосток, ул. Октябрьская, 27, ауд.435
С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ДВФУ.

Отзывы на автореферат просим направлять по адресу: 690091,
г. Владивосток, ул. Октябрьская, 27, ком. 417, кафедра общей экологии.

Факс: (4232) 45-94-09

E-mail: marineecology@rambler.ru

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Ю.А. Галышева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. К важнейшим абиотическим экологическим факторам относятся свет, температура, влага, радиация, давление, состав атмосферы.

Загрязнение атмосферного воздуха является одним из ведущих факторов риска для здоровья населения. К настоящему времени установлена статистически достоверная зависимость от загрязнения атмосферного воздуха заболеваемостью бронхитом, пневмонией, эмфиземой легких, а также другими респираторными заболеваниями. Показано, что атмосферное загрязнение, снижая сопротивляемость организма, сопровождается ростом инфекционных и респираторных заболеваний, а также увеличением продолжительности других болезней (Федорущенко, 2008). Более того, за перенапряжением и срывом защитных функций и снижении адаптационных резервов организма человека следует развитие острых и хронических процессов (Луценко и др., 1992; Health Aspects..., 2004; APHEIS: Air Pollution..., 2005; Христофорова, Сенотрусова, 2005; Луценко, 2006; Skinner, 2007; Глушко, 2010). Проведенные в конце 1990-х годов в городах и регионах России специальные исследования по оценке риска здоровью от воздействия вредных факторов окружающей среды показали, что главным фактором риска является загрязнение атмосферного воздуха взвешенными веществами, что обуславливает наибольшее число дополнительных смертей среди населения (Государственный доклад..., 2003).

Считается, что мелкие частицы воздушных взвесей с диаметром менее 10 мкм (они могут составлять 40-70% взвешенных частиц), легко проникающие в организм человека, наиболее опасны (Driscoll, Maurer, 1991; Кацнельсон и др., 1995; Дорн и др., 2008). Кроме того, взвешенные частицы адсорбируют большое количество токсичных веществ, которые также могут попадать во внутреннюю среду организма.

На сегодняшний день взвешенные в атмосферном воздухе частицы, за которыми ведется мониторинг, согласно Международной организации по стандартизации и Европейского комитета по стандартизации, классифицируются как PM₁₀, PM₄, PM_{2,5} и PM₁ (т.е. частицы с диаметром до 10; 4; 2,5 и 1 мкм соответственно) (Цыро, 2008).

Известно, что состав фоновых атмосферных взвесей на юге Дальнего Востока, и, в частности, во Владивостоке, зависит от циркуляции и интенсивности континентального и океанического переноса воздушных масс. Мощные континентальные переносы пыли (прежде всего, лёсса) из районов центральной Азии, Корейского полуострова и Японских островов на территорию Приморского края наблюдаются в 4 раза чаще океанических. (Кондратьев, 2000). В последние годы во Владивостоке прекратили работу крупные промышленные предприятия, и, таким образом, главную роль в атмосферных взвесях играют частицы природных минералов.

Изучение влияния взвешенных частиц на живые организмы из-за неоднородности состава и многочисленности компонентов затруднено. Считается, что основными источниками природных атмосферных взвесей на нашей планете являются извержения вулканов, пылевые почвенные аэрозоли, смог и пыль лесных пожаров и торфяников, микрометеоритное воздействие (Добровольский, 1983; Богатилов, 2003; Мельчаков, 2007-2009; Юшкин, 2007; Глушко, 2010). В воздушной пыли преобладают кварц, алюмосиликаты, частицы углерода, сульфаты, сульфиды, галит, оксиды железа и их общая масса в атмосфере Земли, по одним оценкам, достигает 20 млн. тонн, а по другим - 0,6-1,6 млрд тонн (Гаррелс, Макензи, 1974; Лисицын, 1978; Богатилов, 2003; Skinner, 2005; Юшкин, 2007).

В современной литературе имеется ряд работ, посвященных изучению токсичности некоторых компонентов естественных взвесей - кварца, эрионита и некоторых других (Дурнев и др., 1990, 1993; Фекличев, 1991a, 1991b; Амосов, Двуреченская, 1992; Thomas, Ballantyne, 1993; Даугель-Дауге и др., 2001; Ilgren et al., 2008). В то же время есть ряд сообщений, показывающих наличие у некоторых минералов

(цеолиты, глины) биологически полезных свойств (Mumpton, Fishman, 1977; Бгатов и др., 1987, 1989; Паничев, 1987а, 1987б, 1989, 1990; Momcilovic, 1999; Бгатова, 2000; Colic, Pavelic, 2000, 2002; Гамидов, 2002, 2004, 2006, 2007; Богомолов и др., 2005; Ivkovic et al., 2005; Katic et al., 2006; Бородин и др., 2003, 2004а, 2004б, 2005, 2009). К сожалению, в этих работах не рассматриваются системные вопросы влияния нано- и микрочастиц минералов как компонентов атмосферных взвесей на организмы на клеточном и организменном уровне и не разработаны адекватные экспериментальные модели оценки влияния.

Иммунная система, наряду с другими регуляторными системами – нервной и эндокринной, играет важную роль при адаптации организма к изменяющимся условиям внешней среды (Агаджанян и др., 2004; Борисова и др., 2004). Система местного иммунитета дыхательных путей легких первой встречается с повреждающими и инфекционными агентами атмосферного воздуха, поэтому изучение ее функциональной активности крайне важно для понимания общих закономерностей влияния микрочастиц атмосферных взвесей на живые организмы (Караулов, Ликов, 2004). Несомненно, что качество и состав атмосферных взвесей влияют и на нормальную и патогенную микрофлору дыхательных путей.

Актуальность данной работы определяется тем, что клеточные, биохимические и микробиологические аспекты влияния типичных компонентов атмосферных взвесей на живые организмы до сих пор остаются не изученными.

Цель работы – выявить ответную реакцию живых организмов на взвешенные в атмосферном воздухе природные микрочастицы.

Для достижения цели были поставлены и решены следующие **задачи**:

- 1) Изучить минеральные виды атмосферных взвесей на примере крупного морского города (г. Владивосток);
- 2) Получить экологическую картину, обусловленную характером частиц, взвешенных в атмосферном воздухе города;
- 3) Исследовать физико-химические свойства типичных компонентов атмосферных взвесей;
- 4) Создать модель для изучения влияния частиц минералов, являющихся типичными компонентами атмосферных взвесей, на живые организмы;
- 5) Исследовать ответную реакцию системы местного иммунитета дыхательных путей крыс на ингаляционное введение минеральных составляющих атмосферных взвесей как отдельно, так и в сочетании с низкой температурой (повреждающим фактором);
- 6) Изучить токсичность нано- и микрочастиц взвесей для животных;
- 7) Исследовать влияние минеральных частиц на межклеточные взаимодействия *in vitro*;
- 8) Изучить влияние типичных представителей атмосферных взвесей на культуры бактерий *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* при разных размерах минеральных частиц.

Научная новизна

В атмосферных взвешах Владивостока, крупнейшего морского города Дальнего Востока с небольшим прессом промышленных предприятий, основными минералогическими типами являются алюмосиликаты (полевошпат, плагиоклазы, глины) и кварц.

Исходя из разнообразия размерных групп атмосферных взвесей и их количества, целесообразно сгруппировать взвешенные частицы в 5 размерных классов: 1) от 0,1 до 1 мкм, 2) от 1 до 10, 3) от 10 до 50, 4) от 50 до 100 и 5) более 100 мкм. Такая группировка позволяет на основе учета доли этих частиц в природной минеральной пыли оценивать их экологический эффект.

Для оценки биологической активности основных компонентов атмосферных взвесей создана экспериментальная модель, построенная на использовании наиболее массовых минералов (алюмосиликаты, кварцы) месторождений Дальнего Востока (как основных компонентов воздушной взвеси данного региона) на естественные мишени - органы, ткани и клетки, которые в норме взаимодействуют со взвешенными в атмосфере частицами или отражают токсическое влияние поступающих агентов.

Разработанные и внедренные в процессе выполнения диссертации 5 патентов РФ (№76566 - разработка экспериментальной модели влияния взвесей на животное, №2372092 - способ измельчения цеолита для ингаляции, №2384324 - использование минералов как адаптогенов, №100263 - способ исследования атмосферных взвесей, положительное решение о выдаче патента по заявке 2009121014 от 02.06.2009 "Способ определения антиоксидантной активности вещества") позволят ускорить и оптимизировать процессы исследования в экологии, физиологии, гистологии и биохимии.

На организменном уровне влияние минералов атмосферных взвесей проявляется в увеличении адаптационных возможностей: стимулировании иммунной системы, повышении антиоксидантной защиты. Так, цеолиты разных месторождений при ингаляции по-разному влияют на систему местного иммунитета дыхательных путей крыс, что проявляется в достоверном изменении жизнеспособности клеток, количества и соотношения основных клеточных типов (альвеолярных макрофагов и лимфоцитов). В зависимости от типа минералов влияние может быть нейтральным (Вангинское месторождение) или слабо повреждающим (Куликовское месторождение).

При воздействии низкой температуры как повреждающего фактора выявлен протекторный эффект ингаляторно введенных цеолитов (1-10 мкм) на систему местного иммунитета дыхательных путей у крыс, который, по-видимому, обусловлен антиоксидантными свойствами минералов. Антиоксидантные свойства *in vitro* обнаружены у частиц кварца, полевого шпата и вулканического стекла при размере от 0,1 до 1 мкм.

На клеточном уровне влияние минералов атмосферных взвесей проявляется в многогранных и иногда во взаимоисключающих механизмах: стимуляции или подавления роста, изменении межклеточных взаимодействий. Так, усиленное индуцирование цитокинов (интерлейкин 1 β (IL-1 β), интерлейкин 10 (IL-10) и гамма-интерферон (IFN- γ)) клетками крови при их контакте с частицами цеолитов (1-10 мкм) свидетельствует об иммуностимулирующем действии цеолитов как антигенов, которое проявляется в повышении клеточной кооперации.

При изучении действия на микроорганизмы цеолитов ряда месторождений, а также вулканического стекла, полевого шпата и кварца Дальнего Востока выявлено, что частицы цеолитов размером от 1 до 10 мкм проявляют либо бактериостатические (Вангинское, Лютогское) либо, напротив, бактериостимулирующие свойства (Куликовское).

Частицы цеолитов менее 1 мкм теряют эффект действия на бактерии. Частицы кварца, полевого шпата и вулканического стекла размером от 0,1 до 1 мкм также нейтральны по отношению к *E. coli* и *S. aureus*.

Теоретическая ценность и практическая значимость работы

Выделен и рассмотрен новый абиотический фактора среды – нано- и микрочастицы природных атмосферных взвесей, который ранее относился к понятию «взвешенные вещества», или «пыль» и не вычленялся из их общего объема.

Показано, что тонкие частицы взвешенных в атмосфере минералов атмосферных взвесей могут проявлять антигенные свойства, т.е. формируют иммунный ответ организма.

Выявленные ответные реакции системы местного иммунитета дыхательных путей под действием частиц атмосферных взвесей являются дополнением к

фундаментальной картине функционального состояния легких, раскрывающей влияние экологического фактора на одну из ведущих систем организма.

Полученные данные о положительном влиянии некоторых минералов на различные системы организма в норме и при охлаждении могут быть использованы в практических сферах здравоохранения и ветеринарии.

Опубликованные материалы используются в учебном процессе и научных исследованиях в Дальневосточном федеральном университете и ряде академических и отраслевых НИИ Сибири и Дальнего Востока.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Атмосферные природные взвеси - абиотический фактор среды, неинертный по отношению к живым организмам, вызывающий различные ответные реакции в зависимости от размера частиц и их минерального типа.
2. Атмосферные взвеси города Владивостока состоят преимущественно из природных минеральных частиц. В их составе по экологическому эффекту выделяются два размерных класса частиц - мельче 1 мкм, которые могут быть опасными для здоровья, и крупнее 1 мкм как неопасные (нейтральные или условно-благоприятные для организма человека).
3. Минеральные частицы взвесей влияют на отклик основных систем, формирующих адаптацию организмов. Действие этих частиц зависит типа минерала, а также физических, химических, гранулометрических и текстурных свойств частиц, и проявляется либо в иммуностимулирующем, антиоксидантном и антимикробном эффектах, помогая живым организмам приспосабливаться к другим экологическим факторам, либо в токсическом воздействии.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы докладывались на IX Дальневосточной молодежной школе-конф. по актуальным проблемам химии и биологии (2005, Владивосток), XVI Национ. Конгр. по болезням органов дыхания (2006, Санкт-Петербург), II междунар. конф. «Стратегические вопросы мировой науки - 2007» (2007, Днепропетровск), III съезде Фармакологов России «Фармакология – практическому здравоохранению» (2007, Санкт-Петербург), II междунар. конф. «Наука та технології: крок в майбутнє - 2007» (2007, Дніпропетровськ), XV Russia-Japan Symposium Medical Exchange (2007, Moscow), IV междунар. семинаре «Минералогия и жизнь: Происхождение биосферы и коэволюция минерального и биологического миров, биоминералогия» (2007, Сыктывкар), IX Тихоокеанской научно-практ. конф. студентов и молодых ученых с междунар. участием, посвященной 50-летию ВГМУ (2008, Владивосток), Объединенном Иммунологическом форуме (2008, Санкт-Петербург), Школе-конф. для молодых ученых «Методы культивирования клеток» (2008, Санкт-Петербург), Межрегион. научно-практ. конф. молодых ученых, посвященной 10-летию Научных центров ВСНЦ СО РАМН «Человек: Здоровье и экология» (2008, Иркутск), 1st Far-Eastern Intern. Symp. on Life Sciences, (2008, Vladivostok), V съезде Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, (2008, Москва), Первом Тихоокеан. Симп. с междунар. участием «Живое и неживое. Вещественные и энергетические взаимодействия» (2008, Владивосток), X Тихоокеан. научно-практ. конф. студентов и молодых ученых с междунар. участием (2009, Владивосток), X Междунар. Конгр. "Современные проблемы в аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии" (2009, Казань), Научно-практ. конф. с междунар. участием «Достижения клинической фармакологии в России и странах СНГ» (2009, Москва), IV Всеросс. научно-практ. конф. «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (2009, Новосибирск), Всеросс. школе-конф. «Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные и клинические исследования» (2009, Москва), IV Национ. Конгр. терапевтов (2009, Москва), II Междунар. симп. «Экологические проблемы человека и животных» (2009, Новосибирск), III Евраз. Конгр. по медицинской физике (2010, Москва), III Архангельской междунар. медиц. науч. конф. (2010, Архангельск), Национ. конф. "Аллергология и клиническая иммунология –

практическому здравоохранению" (2010, Москва), 2nd Moscow Intern. Conf. «Molecular Phylogenetic» (2010, Москва), XXI Съезде физиол. общ. им. И.П. Павлова (2010, Калуга), V Верещагинской Междунар. Байкальской конф. (2010, Иркутск), II Конгр. Междунар. Общ. клинических фармакологов и фармацевтов стран СНГ (2010, Москва), Всероссийской науч. молодежной школы-конф. «Химия под знаком Сигма» (2010, Омск), Всеросс. конф. «Современные проблемы экологии» (2010, Тула), Всеросс. молодёжной науч. конф. «Фундаментальные и прикладные аспекты современной биологии» (2010, Томск), 7th China-Russian Biomedical Forum (2010, Харбин), XV Междунар. конгр. «Экология и здоровье человека» (2010, Самара), IX Росс.-Герм. науч.-практ. конф. Форума им. Р. Коха и И.И. Мечникова (2010, Новосибирск), Всеросс. науч. конф. молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (2010, Санкт-Петербург)....

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 62 работы, в том числе 23 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК, 5 патентов РФ и 1 монография.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 260 страницах. Содержит общую характеристику работы, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, выводы и приложение. Список использованной литературы включает 763 источников, в том числе 311 иностранных работ. Диссертация иллюстрирована 34 таблицами и 44 рисунками.

Благодарности. Выражаю глубокую признательность моему научному консультанту, проф., д.б.н., заслуженному деятелю науки РФ Надежде Константиновне Христофоровой за чуткое руководство и неусыпное внимание к настоящей работе.

Благодарю коллег за помощь в проведении исследований и полезные советы - к.б.н. Анисимову А.А., д.м.н. Бородина Е.А., к.м.н. Штарберга М.А., Чекрыжову И.Ю., к.х.н. Мишакова И.В., к.х.н. Ведягина А.А., д.б.н. Ковалева Н.Н., д.х.н. Козлову С.Г., д.х.н. Мороза Н.К., д.ф.-м.н. Габуду С.П., д.м.н. Кику П.Ф., к.б.н. Памирского И.Э., д.б.н. Болотина Е.И., к.т.н. Никифорова П.А., д.м.н. Запорожец Т.С., д.б.н. Костецкого Э.Я., к.х.н. Мельгунова М.С., к.б.н. Сергеевича А.А., Федотову И.Г.

Особые слова благодарности хочется адресовать ближайшим коллегам д.б.н. Паничеву А.М. и д.т.н. Гулькову А.Н.

Работа выполнена при поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (программа У.М.Н.И.К.), гранта СО РАН ПСО-10 №114, гранта РФФИ 09-04-90781-моб_ст и гранта для молодых ученых ведущих университетов РФ (компания Zeiss).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Природа минеральных частиц как компонентов атмосферных взвесей и их биологическое действие (обзор литературы)

Основными источниками природных атмосферных взвесей являются пылевые почвенные аэрозоли, вулканические извержения, смог и пыль лесных пожаров и торфяников, микрометеоритное воздействие (Добровольский, 1983; Богатилов, 2003; Мельчаков, 2007-2009; Юшкин, 2007; Глушко, 2010).

Оценка атмосферного переноса вещества и общей массы взвесей, произведенные разными авторами, расходятся в десятки и сотни раз, что связано с несовершенством применяемых методик (Глазовский, 2006). Так, по одним оценкам в атмосфере Земли постоянно находится взвесь минералов массой около 20 млн. т, а по другим - 0,6-1,6 млрд т (Гаррелс, Маккензи, 1974; Лисицын, 1978; Богатилов, 2003; Skinner, 2005; Юшкин, 2007). Рассчитана и величина общего переноса атмосферного аэрозоля (5-10 млрд т в год) (Глазовский, 2006).

В ходе циклического обмена между системами «суша – атмосфера» и «океан – атмосфера» взвеси поступают в атмосферу и удаляются из неё вместе с осадками и в форме сухих выпадений (Добровольский, 1998, 2003; Кондратьев, 2000). Частицы размером 10-100 мкм переносятся в нижних слоях тропосферы на сотни – первые тысячи километров, а взвеси с диаметром частиц 1-10 мкм – до 10 тыс. км (Лисицин, 1978). В среднем, взвеси держатся в атмосфере около 5 сут (Warneck, 1988). Концентрация частиц взвеси в атмосфере различна, и даже в одном конкретном месте она сильно меняется во времени (Куценогий, Куценогий, 2000; Рапута и др., 2000; Богатилов, 2003).

Очевидно, что организмы на Земле с момента возникновения жизни и по настоящее время находятся в контакте с частицами атмосферных взвесей, к которой должны были адаптироваться. В процессе эволюции у животных и человека появился довольно эффективный механизм очистки вдыхаемого воздуха: грубые частицы оседают в каналах носоглотки, до 90% мелких частиц задерживается в верхних дыхательных путях и бронхах, удаляясь вместе со слизью при отхаркивании (Юшкин, 2007). Механизм очистки дыхательной системы животных и человека, позволяет выводить из организма самую опасную наиболее мелкую фракцию взвеси. Во многом это обусловлено турбулентным потоком вдыхаемого воздуха, возникающим из-за винтового гофрированного рельефа трахеи и бронхов, а также из-за противотока газов при вдохе-выдохе (Захаров и др., 2006). Альвеолярные макрофаги и некоторые другие клетки в норме могут фагоцитировать твердые водонерастворимые частицы размером до 5-10 мкм (частицы минералов, пыли, сажи), оседающие в дыхательных путях.

Поверхностный слой литосферы образован рыхлым слоем горных пород (корой выветривания), поэтому именно минералы, входящие в её состав (силикаты, оксиды кремния и металлов) являются основным источником частиц атмосферных взвесей (Богатилов, 2003). Учитывая длительную коэволюцию минерального и живого мира, можно предсказать обнаружение в живых системах "рецепторов" к неорганическим кристаллам (Голохваст, 2007).

К настоящему времени в литературе появилось большое количество сообщений, посвященных действию микро- и наночастиц на организмы (Глушкова и др., 2007; Бунятян и др., 2008; Колесниченко и др., 2008). В токсикологии даже выделено направление - нанотоксикология. В подавляющем большинстве этих работах изучается механизм действия и токсичность наночастиц не природного происхождения (металлы и оксиды металлов, квантовые точки, нанотрубки, нановолокна и т.д.).

В то же время, работы по изучению влияния природных минеральных нано- и микрочастиц как компонентов атмосферных взвесей на живые организмы практически отсутствуют.

2. Район работ. Материалы и методы исследования

2.1. Район работ

Анализ природных атмосферных взвесей выполнен на примере города-порта Владивостока и его пригородной зоны. Этот выбор связан с особым расположением города на полуострове, далеко выступающем в море, величиной (самый крупный в ДВФО) и небольшим техногенным прессом, обуславливающим преимущественное нахождение в атмосферной взвеси минеральных частиц (рис. 1).



Рис. 1. Карта Владивостока (масштаб 1:98629) со станциями отбора проб
1-п-ов Шкота,
2- ул. Пушкинская,
3-Первая речка,
4-Вторая речка,
5-Садгород,
6-пос. Емар.

Выбросы большинства промышленных предприятий Владивостока, рассредоточенных по всей территории города, происходят на высоте не более 50 м, за исключением ТЭЦ-1 и ТЭЦ-2, высота труб которых достигает 60-180 м при наибольшем радиусе разброса от 5 до 7 км. Основной объем их выбросов зимой приходится на акватории Амурского (ТЭЦ-1) и Уссурийского (ТЭЦ-2) заливов, летом - на зеленую зону восточной части города (ТЭЦ-2). ТЭЦ-1 работает на мазуте, ТЭЦ-2 - на угле. Остальные предприятия города имеют относительно малые объемы выбросов, с радиусом рассеивания от 0,5 до 3 км (Свинухов и др. 1998; Христофорова, 2005).

Кроме промышленных предприятий, атмосферный воздух Владивостока загрязняют дымом, золой и частичками угля 38 крупных котельных, а также мусоросжигательный завод. При этом в отдельных районах города складывается особая ситуация, зависящая еще и от топографических и микроклиматических условий. Пылевое загрязнение Владивостока в среднем незначительно превышает предельно допустимую концентрацию (ПДК). Максимальные величины изменяются от 1,5 мг/м³ летом до 3,4 мг/м³ весной (Христофорова, 2005).

Ранее отмечалось, что выбросы автотранспорта вносят в загрязнение атмосферы Владивостока до 51% (Христофорова, 2005). На тот момент количество автотранспорта во Владивостоке составляло около 150 тыс. единиц. По данным городской дорожно-транспортной инспекции на 1 января 2010 г, во Владивостоке насчитывалось уже около 350 тыс. единиц автотранспорта (грузовые и легковые автомобили, автобусы и мотоциклы).

Климат Владивостока муссонный: с континентальным атмосферным переносом в зимнее время и морским – в летнее. Во Владивостоке в годовом ходе взвешенных частиц наблюдается два минимума (июль и октябрь) и два максимума (март и декабрь) (Свинухов, 1997).

Хотя Владивосток - морской город, в его атмосферном режиме преобладают ветры, дующие с континента. Расположенные на юге Дальневосточного региона горные системы - Хингано-Буреинская, Сихотэ-Алинь и отроги Черных гор, заходящие с территории Китая на самом юго-западе Приморского края, являются средневысокими и не защищают атмосферу Владивостока от лессов и пыли азиатских пустынь (Христофорова, 2005). Тонкие континентальные взвеси переносятся через территорию Приморского края транзитно и достигают Японских и Гавайских островов (Кондратьев, 2000).

2.2. Материалы и методы исследования

Материалы. В качестве компонентов природных атмосферных взвесей использовались минералы коры выветривания Дальнего Востока: алюмосиликаты - цеолититы Вангинского и Куликовского (Амурская область), Ванчинского (Приморский край), Лютогского месторождений (Сахалинская область), а также полевой шпат, кварц, вулканическое стекло (Приморский край). При определении токсичности наночастиц минералов и агрегации тромбоцитов в эксперименте использовались также Холинское, Шивертуйское и Люльинское месторождения цеолитов и апатит (Кольский п-ов).

Цеолитит или цеолитовый туф - горная порода, состоящая обычно из цеолитов как породообразующих минералов, глинистых минералов и инертных примесей (кварц, полевой шпат, вулканическое стекло и др.).

В качестве лабораторных животных использовались беспородные крысы (100-150 г) и мыши (18-20 г), а также культуры микроорганизмов *E. coli* 25922 и *St. aureus* 209-P и 906.

Экспериментальная модель для изучения влияния типичных представителей атмосферных взвесей на живые организмы

Изучение влияния атмосферных взвесей на живые организмы в эксперименте сопряжено с рядом методических трудностей, таких как невозможность получить достаточное количество сухого вещества взвеси для полноценных экологических исследований, а также изменения состава взвесей в течение года. Это потребовало создания экспериментальной модели, позволяющей минимизировать данные трудности.

Суть модели - подбор аналогов компонентов атмосферных взвесей и размеров частиц этих компонентов. В качестве аналогов компонентов природных атмосферных взвесей использовались минералы коры выветривания Дальнего Востока и Сибири: цеолититовые туфы, кварц, полевой шпат, вулканическое стекло.

Как было отражено выше, с помощью лазерного анализатора были определены размеры частиц естественных взвесей. Для измельчения частиц минералов до размеров, которые являются естественными для природных взвесей, использовались ультразвуковой дезинтегратор Bandelin Sonopulse 3400 (Италия) (до размеров 1-10 мкм) и планетарная мельница Fritch Pulverisette (Fritch, Германия) (до размеров от 100 нм до 1 мкм).

Методы исследования

Анализ атмосферных взвесей. Пробы собирались либо как атмосферные осадки (снег), либо как пробы воздуха, прокачиваемые через пробоотборник.

Снег собирался в момент снегопада. Чтобы исключить вторичное загрязнение антропогенными аэрозолями, был собран верхний слой (5-10 см) только что выпавшего снега. Его помещали в стерильные контейнеры объемом 1 л. Через пару часов, когда снег в контейнерах растаял, из каждого образца, после взбалтывания, набирали 40 мл жидкости и анализировали на лазерном анализаторе частиц Analysette 22 NanoTech (фирма Fritsch), позволяющем в ходе одного измерения устанавливать распределение частиц по размерам, а также определять их форму.

Сбор атмосферных взвесей осуществлялся с помощью пробоотборника LSV 3.1 (Германия) с оголовниками PM 10, 4, 2,5 и 1 в тех же районах, где собирались и атмосферные осадки. Анализ образцов (кусочки фильтров) проводили на сканирующем микроскопе JEOL JSM 6490LV (JEOL, Япония). Минералогический анализ взвесей производили на микроскопе Zeiss Discovery V12 (Германия).

Физико-химическое исследование минералов

Изучение макро- и микроэлементного состава минералов проводили методами атомно-абсорбционной спектрофотометрии (ААС), рентгено-флуоресцентного анализа с использованием синхротронного излучения (РФА-СИ) и нейтронно-активационного

анализа (НАА). Методом инфракрасной (ИК) спектроскопии изучено распределение воды на поверхности и внутри каналов цеолитов. Для изучения кислотных центров на поверхности цеолитов использовали ИК-спектроскопию с адсорбцией азота при 77⁰К. Текстуальные характеристики изучали методом ртутной порометрии (в Институте катализа им. Г.К. Борескова СО РАН). Методом ядерно-магнитной резонансной (ЯМР) спектроскопии изучено содержание цеолитов в туфе (в Институте неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН).

Морфологический анализ частиц осуществлялся на сканирующем микроскопе JEOL JSM 6490LV (JEOL, Япония) (в Дальневосточном геологическом институте ДВО РАН).

Определение электрокинетического потенциала (ζ -потенциал) минеральных частиц в электролите 0,9% NaCl проводили с использованием прибора ZetaSizer Nano ZS (Malvern, Великобритания) при температуре 25 °С, фиксированном угле рассеяния 173° и длине волны лазера 633 нм (в Институте химии ДВО РАН).

Оценка влияния частиц цеолитов (1-10 мкм) на лабораторных животных при ингаляционном введении

В опыт брали 120 самцов беспородных крыс возрастом не старше 2,5 мес, массой 100-150 г. Перед выполнением работ всех животных содержали в одинаковых условиях. Не менее 10 дней перед началом эксперимента крысы получали полноценный пищевой рацион в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (1977). Экспериментальное охлаждение проводили для выяснения сочетанного влияния низкой температуры и атмосферных взвеси как абиотических факторов среды. Для этого использовали климатическую камеру "ILKA" (Feutron, ГДР), где при соблюдении адекватных условий влажности и вентиляции задавалась температура -15⁰С. Охлаждение проводилось в течение 15 сут по 3 ч в день. Контрольные животные находились при температуре + 20 ...+22⁰С.

Ингалирование измельченных минералов (доза 100 мг/м³) производилось животным с помощью ультразвукового портативного ингалятора УП-0,25 "АРСА" в закрытой целлофаном клетке объемом 1 м³. Все животные были разделены на 6 групп по 20 особей: «К» – животные, не подвергавшиеся воздействиям, т.е. контрольные; «Х» – животные, подвергавшиеся действию низких температур; «В» – животные, которым ингаляционно вводились цеолиты Вангинского месторождения, «ХВ» – охлаждаемые животные, которым ингаляционно вводились цеолиты Вангинского месторождения, «Кул» - животные, которым вводились цеолиты Куликовского месторождения и «ХКул» - охлаждаемые животные, которым вводились цеолиты Куликовского месторождения.

Для оценки влияния минеральных взвесей на организм животных производили препарирование, забор материала, бронхоальвеолярный смыв, окраску и приготовление мазков для световой микроскопии. Объектом исследования являлись макрофаги и лимфоциты как наиболее массово представленные клетки в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ). Жизнеспособность клеток выявляли витальной окраской трипановым синим. Подсчет клеток велся по стандартной методике в камере Горяева. Для светооптической морфометрии использовался микроскоп "Zeiss Observer A1" (Zeiss, Германия), для фотосъемки - "Axio Cam" (Zeiss, Германия).

Оценка антиоксидантной активности частиц цеолитов (1-10 мкм) *in vivo* и кварца, полевого шпата и вулканического стекла (0,1-1 мкм) *in vitro*

Оценку антиоксидантной активности проводили по содержанию основных компонентов антиоксидантной системы (АОС) (витамин Е, церулоплазмин) и продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) (диеновых конъюгат, малонового альдегида (МДА) и гидроперекисей). В опыт брали 120 самцов беспородных крыс возрастом не старше 2,5 мес, массой 100-150 г. Перед началом биохимического исследования готовили

гомогенаты легких, в которых определяли компоненты АОС и ПОЛ. Липиды крови и тканей экстрагировали по методу Блайя-Дайера (Кейтс, 1975). Определение церулоплазмينا в плазме крови производили по методу, основанному на окислении р-фенилендиамина при участии церулоплазмينا (Колб, Камышников, 1976). МДА определяли в плазме крови и гомогенатах легких по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) (Бородин, Арчаков, 1987). Определение диеновых конъюгатов проводили по методу Е.А. Стальной (1977). Количество гидроперекисей липидов определяли на основе их способности окислять ионы Fe^{2+} с последующим взаимодействием Fe^{3+} с тиоцианатом аммония (Романова, Стальная, 1977). Содержание витамина Е определяли в липидных экстрактах плазмы крови и тканей по цветной реакции с дипиридилем и $FeCl_3$ (Кисилевич, 1972) в модификации М.А. Штарберга (1996).

Определение ПОЛ в суспензии микросом при добавлении частиц минералов проводили по методике Е.А. Бородина с соавт. (1992).

Для проверки рабочей гипотезы, согласно которой антиоксидантная активность минералов зависит от их способности сорбировать ионы Fe^{2+} , к 1 мл 1,28 мМ Fe^{2+} добавляли от 10 до 100 мг минерала. В качестве источника Fe^{2+} использовали соль Мора ($FeSO_4 \cdot (NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$). Далее смесь центрифугировали, отбирали 0,1 мл надосадочной жидкости и определяли в ней содержание ионов Fe^{2+} по цветной реакции с $K_3[Fe(CN)_6]$ (Голохваст и др., 2010).

Изучение токсичности частиц цеолитов при ингаляционном (1-10 мкм) и пероральном (0,1-1 мкм) введении

Для определения токсичности цеолитов при ингаляционном введении у тех же интактных животных (беспородных крыс), которые использовались при изучении антиоксидантной активности *in vivo* и влияния на систему местного иммунитета дыхательных путей, забирался материал для получения полутонких срезов препаратов печени, почек, легких. Срезы окрашивались гематоксилином-эозином и метиленовым синим.

Для определения токсичности цеолитов при пероральном введении использованы неинбредные мыши самцы (масса 18-20 г). Они получали цеолит с пищей в дозировке 3 – 5% от массы тела. Животных разделили на 16 экспериментальных групп по 8 особей в каждой, в том числе: "Контроль" - животные, которые не получали цеолит; "Куликов-м", "Куликов-у", "Куликов-н" - мыши, которые получали цеолиты Куликовского месторождения после механической, ультразвуковой и планетарной обработок. "Вангин-м", "Вангин-у", "Вангин-н" - получали цеолиты Вангинского месторождения с аналогичной обработкой; "Люльин-м", "Люльин-у", "Люльин-н" - получали цеолиты Люльинского месторождения; "Шивертуй-м", "Шивертуй-у", "Шивертуй-н" - цеолиты Шивертуйского месторождения; "Холин-м", "Холин-у", "Холин-н" - мыши, которые получали Холинские цеолиты.

Изучение механизмов иммуностимулирующего действия частиц цеолитов (1-10 мкм)

Для исследования механизмов иммуностимулирующего действия минералов было изучено влияние цеолита Лютогского месторождения (далее «Цеолит») на продукцию цитокинов *in vitro* по стандартному методу Де Грута с соавт. (De Groote et al., 1992). При исследовании спонтанного синтеза цитокинов частицы минералов добавляли в кровь интактных доноров (n=8) в конечной концентрации 5 и 50 мг/мл. Для изучения митогениндуцированной продукции цитокинов во все пробы вносили фитогемагглютинин (ФГА) в конечной концентрации 10 мкг/мл. Продукцию IL-1 β и IL-10 оценивали через 24 ч инкубации, продукцию IFN- γ – через 72 ч. Костимулирующее влияние цеолита изучали при его совместном действии с ФГА. Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂, после чего отбирали супернатанты и определяли концентрацию цитокинов, которую

измеряли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем «Протеиновый контур» (IFN- γ , IL-10) и «Цитокин» (IL-1 β).

Изучение влияния минералов на межклеточные взаимодействия

В качестве модели для этого исследования взята агрегация тромбоцитов. Наблюдения проводили на анализаторе агрегации тромбоцитов AP 2110 («Солар», Беларусь), совмещенного с компьютером, в спектральном диапазоне от 500 до 700 нм. В основе принципа работы агрегометра лежит метод светорассеяния (турбидиметрический метод), предложенный С. Борном (Born, 1962), с дополнениями И.Э. Памирского с соавторами (2010). Спектрофотометрически (при длине волны 259 нм) была измерена оптическая плотность растворов АДФ (концентрация АДФ составляла около 12,5 мкМ на 1 мл физиологического раствора), и затем этих же растворов после внесения суспензий минералов (0,1 мл 1% суспензии на 3 мл раствора АДФ, или около 200-250 мкг минеральных частиц на мл; смесь не инкубировали) и центрифугирования в течение 10 минут при 2000 g.

Оценка микробиологической активности частиц минералов (0,1-1 мкм и 1-10 мкм)

Для определения микробиологической активности цеолитовых туфов Вангинского, Куликовского и Лютогского месторождений, а также кварца, полевого шпата и вулканического стекла были взяты культуры условно-патогенных бактерий *E. coli* 25922, *St. aureus* 209-P и 906, полученные из ГИСК им. Л.А. Тарасевича (Москва). В работе использовали стандартные методики и культуральные среды: желточно-солевой агар (ЖСА), мясо-пептонный агар (МПА) и среда Эндо. Цеолитовые породы, кварц, полевой шпат и вулканическое стекло в двух размерных фракциях (0,1-1 мкм и 1-10 мкм) применялись как стерильные (обработка паровой стерилизацией при температуре 120⁰С в течение 1 ч), так и нестерильные. Для изучения длительности антимикробного воздействия после приготовления раствора (1 млрд. клеток) по стандарту мутности минералы инкубировали вместе с бактериями в течение 30 мин, 1 ч, 24 ч. Затем согласно стандартным методикам сеяли суспензию на МПА и среду Эндо и помещали в термостат на 24 ч при температуре 37⁰С, после визуально подсчитывали число КОЕ.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Качественный и количественный анализ взвеси атмосферных осадков

К настоящему времени методики исследования природных взвесей позволяют определять химический (элементный) и гранулометрический составы, а также физико-химические свойства. Каждый из методов имеет свои преимущества и недостатки. Классификация взвешенных в атмосферном воздухе частиц только по размеру не учитывает состав и физико-химические характеристики компонентов. В свою очередь, только химический анализ взвесей может выявить наличие в них токсичных веществ, но не позволяет оценить размер и свойства частиц. Нами использован метод гранулометрического анализа атмосферных взвесей с последующим минералогическим анализом.

Пробы снега (N=5) собирались на шести станциях, различающихся экологическими условиями, расположенных как непосредственно в черте города, так и в его пригородной зоне (рис. 1). Среди них наиболее экологически напряженными являются станции, находящиеся в микрорайонах Первой и Второй речек (Христофорова, 2005).

Согласно принятой классификации (Ивлев, Довгалоук, 1999), различаются по размерам три класса аэрозольных частиц: мелкодисперсные ($r \leq 0,1$ мкм),

среднедисперсные ($0,1 \text{ мкм} < r < 1 \text{ мкм}$) и грубодисперсные ($r \geq 1 \text{ мкм}$). Анализируя атмосферные взвеси города, мы разделили их по размерам частиц, согласно данным лазерного анализатора, на пять классов: 1) от 0,1 до 1 мкм (соответствует PM1), 2) от 1 до 10 (соответствует PM10), 3) от 10 до 50, 4) от 50 до 100 и 5) $> 100 \text{ мкм}$.

Результаты разделения по фракциям и физико-техническим характеристикам частиц взвесей, обнаруженных в снеге, приведены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Распределение частиц в снеге по фракциям на станциях отбора проб

		Районы отбора проб											
		Ул. Пушкинская		Первая речка		Вторая речка		П-ов Шкота		Садгород		Пос. Емар	
Класс и Ø, мкм		Ø, мкм	доля, %	Ø, мкм	доля, %	Ø, мкм	доля, %	Ø, мкм	доля, %	Ø, мкм	доля, %	Ø, мкм	доля, %
1.	0,1 - 1			0,15 - 0,3	10								
2.	1 - 10	2-5	2	2-3	2-3			2-3	5				
				5-7	15	4 - 8	20	4-8	65	5-10	5	6-10	2
3.	10-50	15-20	2	12 - 20	20-25								
				40-50	50	30-40	25	30-45	30	25-35	10		
4.	50 - 100	40-50	2			40-70	55						
5.	> 100	200-450	94									300-500	95
										400-1000	85	600-1000	3

Как можно видеть из табл. 1, частицы с диаметром менее 10 мкм в малых количествах встречаются на всех станциях отбора. Наибольшее же количество мелких частиц, взвешенных в атмосферном воздухе, выявлено на полуострове Шкота – 70%. На станциях отбора проб, расположенных в районах Первой и Второй речек, доля тонких частиц во взвеси оказалась близкой – 28% и 20% соответственно. Однако в районе Первой речки, единственном из шести обследованных мест, значительной была доля очень тонких частиц ($< 1 \text{ мкм}$) – 10%.

В атмосферной взвеси пос. Емар заметно преобладали крупные частицы, с размером 300 – 500 мкм (95%). В Садгороде еще более крупные частицы (400 – 1000 мкм) составляли 85% взвеси. Таким образом, в этих двух районах с наименьшим техногенным прессом в составе атмосферной взвеси доминировали крупные частицы.

Однако на ул. Пушкинской, испытывающей воздействие грузового и легкового автотранспорта, в составе взвеси также преобладали крупные частицы (94%), правда, с немного меньшими размерами (200 – 450 мкм), чем в пос. Емар.

Наши результаты в целом соотносятся с данными литературы. Так, считается, что в атмосферных аэрозолях преобладают частицы размером менее 1 мкм (Глазовский, 2006). По данным Х.Е. Юнге (1965), доля частиц Айткена, то есть частиц размером менее 0,1 мкм, составляют не более 10-12%. По другим данным, доля частиц размером менее 5 мкм составляет 95%, но по массе - всего 7% (Глазовский, 2006).

Более детальные физические характеристики частиц взвеси, обнаруженных в снеге, которые также получены с помощью лазерного анализатора, приведены в табл. 2.

Таблица 2

Морфометрические параметры частиц взвеси, содержащихся в снеге в различных районах г. Владивостока

Параметры /район	Ул. Пушкинская	Первая речка	Вторая речка	П-ов Шкота	Садгород	Пос. Емар
Средний арифметический диаметр, мкм	340,77	21,56	36,46	15,073	727,18	398,40
Мода, мкм	354,42	34,09	53,25	5,52	864,75	367,84
Медиана, мкм	350,54	16,12	33,41	6,01	837,67	378,27
Отклонение, мкм ²	3977,94	196,77	335,12	182,02	100637,5	11563,30
Среднеквадратичное отклонение, мкм	63,07	14,03	18,30	13,49	317,23	107,53
Коэффициент отклонения, %	18,51	65,06	50,21	89,51	43,62	26,99
Удельная поверхность, см ² /см ³	358,44	31550,17	3300,40	8259,42	850,76	201,41
Удельная поверхность, см ² /г	179,22	15775,08	1650,20	4129,71	425,38	100,70

Морфометрия частиц, содержащихся в снеге, к сожалению, не дает информации о токсичности выделенных ранее размерных фракций. Объясняется это тем, что полученные значения (например, в случае с образцами атмосферной взвеси из районов «Первая речка» и «Пушкинская», содержащих четыре и более размерных фракций) усредняются анализатором, что не позволяет соотнести характеристики частиц непосредственно с их размерами. Несмотря на это, анализ параметров частиц может дать важную дополнительную информацию. Так, очень развитая удельная поверхность частиц, характерная для взвеси из района Первой речки, указывает на их высокую сорбционную способность. Эти частицы могут сорбировать на себе и приносить во внутреннюю среду организма как жидкие, так и газообразные токсичные вещества.

Как следует из табл. 2, на п-ве Шкота заметно преобладают мелкие частицы, о чем свидетельствуют значения моды и медианы, однако размер этих частиц сильно варьирует, на что указывает самый высокий коэффициент отклонения – 89,5%. Их удельная поверхность существенно меньше, чем в районе Первой речки. По-видимому, заметный вклад (65%) частиц с размерами 4-8 мкм и, очевидно, их сферическая форма играют свою роль в снижении этого параметра. В то же время по величине удельной поверхности частицы с этой станции занимают второе место.

Развитой поверхностью контакта со средой обладают частицы взвеси и в районе Второй речки, хотя она на порядок величин меньше, чем у частиц в районе Первой речки. Можно думать, что заметное количество очень мелких частиц на этой станции обусловлено характером рельефа (падь), близостью ТЭЦ, работающей на жидком топливе, застоем дымов и выхлопов автомобилей, опускающихся в низину. Мусоросжигательный завод, расположенный рядом со станцией отбора проб на Второй речке, по-видимому, не поставляет в атмосферу столь тонких частиц, как ТЭЦ, либо (что весьма возможно) их существенно меньше.

При микроскопии образцов атмосферных взвесей в них были выделены основные типы природных минералов. В образце, взятом на полуострове Шкота (рис. 2А), были определены: кварц, полевой шпат, кварц-полевошпатовые сростки, кварц с малахитовыми пленками, каолинит, кремниво-железооксидные частицы, стекловатые частицы, техногенные частицы неустановленного происхождения, плагиоклазы, частицы бетона, шлаковые спеки, стекла. В образце, взятом на Первой речке (рис. 2Б), были определены: сажа, кварц, полевой шпат, битумные (асфальтовые) частицы, стекла.

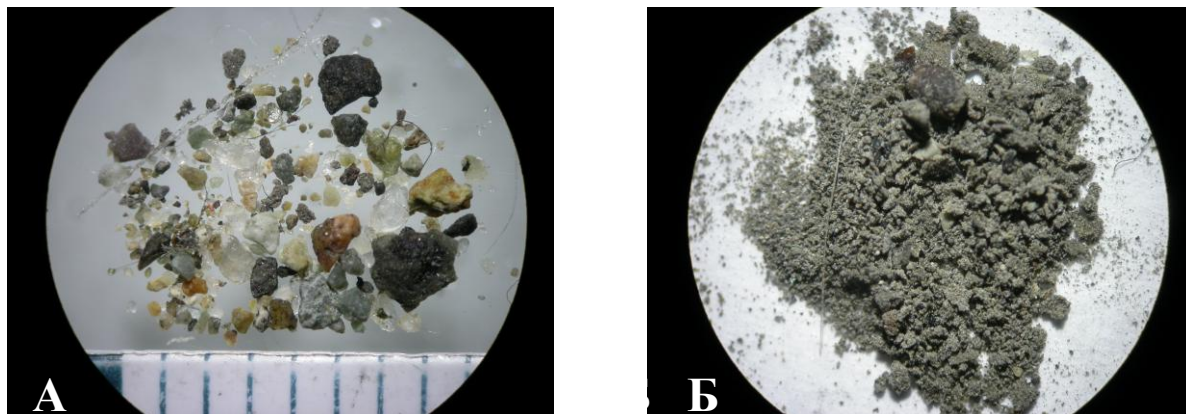


Рис. 2. Минеральная взвесь из образца снега, собранного на полуострове Шкота (А) и на Первой речке (Б). Цена деления линейки – 1 мм. Увеличение $\times 320$.

Согласно литературным данным, наиболее опасными считаются частицы размером от 50-100 нм до 1 мкм (Хотимченко и др., 2009). Таковые обнаружены в районе «Первая речка» (10%). Мелкодисперсные фракции (от 1 до 10 мкм), вторые по потенциальной опасности. В заметных концентрациях (более 20% от общего числа частиц) они обнаружены в районах «Полуостров Шкота» и «Вторая речка». Техногенные частицы нано- и микродиапозона, согласно С.А. Хотимченко с коллегами (2009), относятся, скорее всего, к частицам сажи. Среди более крупных частиц (от 10 до 100 мкм) также имеются техногенные по происхождению - сажа, фрагменты асфальта, частицы бетона, синтетических волокон и пластмасс, а также автомобильная резина. В образцах из района «Емар» преобладают наименее опасные, с точки зрения экологии и гигиены, частицы, размером более 100 мкм (вплоть до 1 мм), которые визуально представляют собой песок и гравий. Районы «Садгород» и «Емар» в целом считаются относительно благополучными с точки зрения экологической нагрузки.

Таким образом, можно заключить, что впервые при анализе нано- и микрочастиц атмосферных взвесей довольно крупного города с использованием лазерного анализатора Analysette 22 NanoTech (фирма Fritsch) выделены 5 классов частиц размером от 1) 0,1 до 1 мкм, 2) от 1 до 10, 3) от 10 до 50, 4) от 50 до 100 и 5) более 100 мкм.

Оценка атмосферной взвеси города Владивостока в целом, показывает, что в ней преобладают размерные фракции 3 класса (35-50%). Мелкодисперсные фракции 2 класса составляют 20% от общего числа частиц, взвеси наночастиц 1 класса - 10%.

В зонах относительного экологического благополучия в атмосферной взвеси наблюдаются преимущественно крупнодисперсные частицы 5 размерного класса (85 - 98%), содержание мелкодисперсных частиц 2 и 3 классов в этих зонах составляет 5 - 10%.

Полученные данные позволяют провести первичное экологическое районирование г. Владивостока по содержанию нано- и микрочастиц атмосферных взвесей. По степени экологической опасности районы города Владивостока выстраиваются по убыванию в следующий ряд: Первая речка, п-ов Шкота, Вторая речка, Пушкинская, Садгород и пос. Емар.

3.2. Ответная реакция системы местного иммунитета дыхательных путей на ингаляционное введение частиц цеолитов (1-10 мкм)

При исследовании влияния частиц минералов на систему местного иммунитета дыхательных путей оценивались количество клеток в 1 мл лаважной жидкости, жизнеспособность клеток, соотношение наиболее массовых клеток - альвеолярных макрофагов и лимфоцитов и их морфометрические показатели.

Общее количество клеток в группе «К» (Контроль) составило $1,5 \pm 0,1 \cdot 10^5$ в 1 мл, в группе «Х» (Холод) – $5,8 \pm 0,4 \cdot 10^5$, в группе «В» (Вангинское) – $1,8 \pm 0,12 \cdot 10^5$, в группе

“ХВ” (Холод-Вангинское)– $2,5 \pm 0,15 \cdot 10^5$, в группе “Кул” (Куликовское) - $2,1 \pm 0,1 \cdot 10^5$, в группе “ХКул” (Холод-Куликовское) – $3,2 \pm 0,2 \cdot 10^5$ в 1 мл.

Количество жизнеспособных клеток в группе “К” составило $88,2 \pm 4,3\%$, в группе “Х” - $61 \pm 3,7\%$, в группе “В” – $82 \pm 3,5\%$, в группе “ХВ” - $77 \pm 3,9\%$, в группе “Кул” – $78 \pm 3,6\%$, в группе “ХКул” - $71 \pm 3,5\%$.

Макрофаги и лимфоциты в разных группах выявлялись в разных пропорциях. В группе “К” макрофаги составляли $60 \pm 3,4\%$, лимфоциты – $30 \pm 1,7\%$, в группе “Х” - $23 \pm 1,6\%$ и $65 \pm 3,2\%$ соответственно, в группе “В” – $66 \pm 2,5\%$ и $21 \pm 1,7\%$, в группе “ХВ” – $48 \pm 2,2\%$ и $40 \pm 1,8\%$, в группе “Кул” – $69 \pm 2,6\%$ и $20,2 \pm 1,5\%$, в группе “ХКул” – $42 \pm 2,3\%$ и $44 \pm 2,1\%$ соответственно. Недостающие проценты приходятся на прочие клеточные элементы бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ): нейтрофилы, эпителий и др.

Сравнение этих данных показывает, что количество жизнеспособных клеток (82%) в группе “В” достоверно не отличалось от результатов в группе “К” (88,2%). Это может свидетельствовать о том, что цеолиты Вангинского месторождения не вызывают выраженного ответа со стороны системы местного иммунитета. Визуально при световой микроскопии клетки в группе “В” отличались от клеток группы “К” только наличием фагосом.

Общее количество клеток в группе “В” ($1,8 \pm 0,12 \cdot 10^5$ в 1 мл) и группе “К” ($1,5 \pm 0,1 \cdot 10^5$ в 1 мл) также достоверно не различается, хотя заметна явная тенденция к увеличению удельного количества клеток в группе “В” (на 20%). Цеолиты являются для клеток источником микроэлементов, нормализующих и улучшающих все обменные процессы (Богданов, Белицкий, 1990).

Клеточный состав БАЛ в группе “В” (66% макрофагов и 21% лимфоцитов), обнаруживает тенденцию к увеличению доли макрофагов и снижению доли лимфоцитов по сравнению с контролем (60% макрофагов и 30% лимфоцитов). При этом, в группе “В” по сравнению с группой “К” у макрофагов наблюдалось увеличение округлости на 24%, длины - на 12%, уменьшение ядерно-цитоплазматического соотношения в 3,7 раз. У лимфоцитов группы “В” по сравнению с группой “Контроль” выявлено уменьшение округлости ядра на 21%, увеличение ядерно-цитоплазматического соотношения на 10,4%. Влияние цеолита Вангинского месторождения на систему местного иммунитета дыхательных путей животных проявляется в морфологических изменениях макрофагов, в частности, в увеличении доли цитоплазмы, что может свидетельствовать об активном фагоцитозе. Дополнительно к этому макрофаги группы “Вангин” визуально характеризовались обилием в цитоплазме фагосом, наполненных частицами цеолитов.

В группе “ХВ” количество жизнеспособных клеток (77%) достоверно не отличалось от результатов в группе “К” (88,2%), тогда как в группе “Х” оно составляло лишь 61%. Таким образом, цеолиты Вангинского месторождения обладают заметным протекторным свойством для клеток БАЛ при повреждающем действии холода. Далее, если сравнивать количество клеток в группе “ХВ” ($2,5 \cdot 10^5$ в 1 мл) с данными в группах “К” ($1,5 \cdot 10^5$ в 1 мл) и “Х” ($5,8 \cdot 10^5$ в 1 мл), а также относительное количество макрофагов и лимфоцитов в группах “ХВ” (48% макрофагов и 40% лимфоцитов), “К” (60% и 30% соответственно) и “Х” (23% и 65% соответственно), то можно сделать следующие выводы. Удельное количество клеток в БАЛ в группе “ХВ” более чем в 2 раза меньше того же показателя в группе “Х”, что свидетельствует о существенной компенсации повреждающего действия холода цеолитом в группе “ХВ”. При этом, если в группе “Х” наблюдалось инвертирование относительного количества макрофагов и лимфоцитов по сравнению с контрольной группой, то в группе “ХВ” было отмечено преобладание макрофагов. Из сказанного следует, что частицы цеолитов Вангинского месторождения снижают негативное действие холода, что проявляется в уменьшении общего количества клеток, повышении жизнеспособности клеток и нормализации популяционного соотношения макрофагов и лимфоцитов.

В группе “ХВ” по сравнению с группой “К” у макрофагов наблюдалось уменьшение площади клетки на 11%, площади ядра - на 32%, ядерно-цитоплазматического соотношения - на 14%. Морфологически макрофаги группы “ХВ” мало отличались от макрофагов контрольной группы. В их цитоплазме также отмечены фагосомы, предположительно заполненные цеолитом. Уменьшение на треть показателя “площадь ядра” вызвано угнетающим действием холода. При сравнении макрофагов групп “ХВ” и “Х” выявлены следующие изменения: увеличение длины ядра на 10,2%, площади ядра - на 51%, ядерно-цитоплазматического соотношения - в 4,4 раза. У лимфоцитов группы “ХВ” по сравнению с группой “К” выявлено лишь увеличение ядерно-цитоплазматического соотношения на 14%. Очевидно, лимфоциты в этой экспериментальной группе морфометрически незначительно отличались от лимфоцитов в группе “К”. При сравнении лимфоцитов групп “ХВ” и “Х” наблюдалось уменьшение ядерно-цитоплазматического соотношения на 15,5%. По-видимому, цеолиты Вангинского месторождения при холодовом повреждении животных оказывают компенсирующее воздействие преимущественно на макрофаги.

В целом, можно отметить отсутствие ответной реакции системы местного иммунитета дыхательных путей у крыс на частицы цеолитов Вангинского месторождения (1-10 мкм).

Цеолиты Куликовского месторождения, в отличие от цеолитов Вангинского месторождения, снижали количество жизнеспособных клеток (78%) по сравнению с группой “К” (88,2%). По-видимому, такой эффект цеолита Куликовского месторождения скорее всего обусловлен механическим повреждением клеток и тканей структурой основного минерала – морденита.

Общее количество клеток в группе “Кул” ($2,1 \cdot 10^5$ в 1 мл) и группе “К” ($1,5 \cdot 10^5$ в 1 мл) достоверно различается на 40%. По-видимому, столь выраженная миграция из тканей или пролиферация клеток БАЛ при запылении морденитом является ответной реакцией на повреждение, вызванное структурными особенностями данного вида цеолита. Напомним, что цеолит Вангинского месторождения, являясь по своей минеральной структуре более биологически нейтральным, увеличивал общее число клеток всего лишь на 20% по сравнению с контролем.

Клеточный состав БАЛ в группе “Кул” (69% макрофагов и 20% лимфоцитов) обнаруживает ту же тенденцию к увеличению доли макрофагов и снижению доли лимфоцитов по сравнению с группой “К” (60% макрофагов и 30% лимфоцитов), как и при ингаляции Вангинских цеолитов (66% и 21% соответственно). В группе “Кул” по сравнению с группой “К” у макрофагов наблюдалось увеличение округлости клеток на 28%, длины ядра - на 20%. У лимфоцитов группы “Кул” по сравнению с группами “К” и “В” достоверных отличий не обнаружено.

Можно предположить, что незначительное повреждающее действие цеолита Куликовского месторождения обусловлено механическим повреждением клеток структурой основного минерала - морденита, имеющего кристаллическую решетку с острыми гранями.

В группе “ХКул” количество жизнеспособных клеток понижалось до 71% и достоверно отличалось от результатов в группе “К” (88,2%), но превосходило их количество в группе “Х” (61%). Таким образом, цеолиты Куликовского месторождения также обладают протекторным свойством для клеток БАЛ при повреждающем действии холода, как и цеолиты Вангинского месторождения. Если сравнить количество клеток в группе “ХКул” ($3,2 \cdot 10^5$ в 1 мл) с данными в группах “К” ($1,5 \cdot 10^5$ в 1 мл) и “Х” ($5,8 \cdot 10^5$ в 1 мл), а также относительное количество макрофагов и лимфоцитов в группах “ХКул” (42% макрофагов и 44% лимфоцитов), “К” (60% и 30% соответственно) и “Х” (23% и 65% соответственно), то можно сделать следующий вывод. Ответная реакция системы местного иммунитета на введение цеолита Куликовского месторождения при охлаждении аналогична реакции на цеолит Вангинского месторождения в сочетании с холодом

(количество клеток в БАЛ в группе “ХКул” почти в 2 раза меньше того же показателя в группе “Х” и наблюдается тенденция к нормализации холодового инвертирования макрофагов и лимфоцитов).

В группе “ХКул” по сравнению с группой “К” у макрофагов наблюдалось уменьшение площади клеток на 22%, площади ядра - на 20%. Морфологически макрофаги группы “ХКул” также мало отличались от контрольной группы и в их цитоплазме отмечены аналогичные фагосомы. У лимфоцитов группы “ХКул” отличий по сравнению с группой “К” выявлено не было.

Как и в случае с ингаляционным введением частиц цеолитов Вангинского месторождения одновременно с холодовым воздействием, при действии целлитов Куликовского месторождения также наблюдается нивелирование отрицательного влияния низких температур.

3.3. Влияние частиц цеолитов (1-10 мкм) на продукцию цитокинов

Для исследования механизма иммуностимулирующей активности цеолита нами изучены спонтанное и митогенстимулированное продуцирование цитокинов – интерлейкинов IL-1 β и IL-10, а также гамма-интерферона (IFN γ) нейтрофилов крови человека в норме и при добавлении цеолитов Лютогского месторождения. Нейтрофилы, как и альвеолярные макрофаги и лимфоциты, входят в состав бронхоальвеолярной жидкости (Bernardo, 1983, Ерохин, 1987). Также считается (Дорн и др., 2008), что нейтрофилы, как и макрофаги, при пылевой нагрузке вызывают каскад окислительных реакций в легких, ведущий к иммунным нарушениям. Это обусловило их выбор в качестве объекта наблюдения.

При спонтанной продукции цитокинов были выявлены дозозависимые эффекты. Содержание IL-1 β в контрольной группе составило $169,57 \pm 17,77$, при добавлении 5 мг/мл цеолита - $246,07 \pm 8,03$ ($p=0,567$), при добавлении 50 мг/мл - $350,34 \pm 10,58$ ($p=0,017$). Содержания IFN γ в контрольной группе составляло $347,63 \pm 23,10$, при добавлении 5 мг/мл цеолита - $255,74 \pm 17,24$ ($p=0,07$), при добавлении 50 мг/мл - $559,28 \pm 80,65$ ($p=0,005$). Содержание IL-10 в контрольной группе составило $42,91 \pm 3,38$, при добавлении 5 мг/мл цеолита - $36,90 \pm 1,47$ ($p=0,29$), при добавлении 50 мг/мл - $85,59 \pm 4,98$ ($p=0,007$).

Таким образом, минералы атмосферных взвесей (на примере цеолитов Лютогского месторождения) проявляют иммуностимулирующие свойства *in vitro* в дозировках 5 и 50 мг/мл, выявляющиеся в усилении спонтанной индукции INF γ в 1,6 раза, а также IL-1 β и IL-10 в 2 раза.

При спонтанной стимулированной фитогемагглютинином (ФГА) продукции цитокинов были получены следующие результаты. Содержание IL-1 β в контрольной группе мышей составило $3836,69 \pm 100,76$, при добавлении 5 мг/мл цеолита - $2617,74 \pm 93,12$ ($p=0,043$), при добавлении 50 мг/мл - $1071,66 \pm 44,13$ ($p=0,043$). Содержание IFN γ в контрольной группе составляло $2745,93 \pm 62,05$, при добавлении 5 мг/мл цеолита - $8556,80 \pm 453,75$ ($p=0,029$), при добавлении 50 мг/мл - $7008,60 \pm 122,96$ ($p=0,025$). Содержание IL-10 в контрольной группе составляло $116,06 \pm 7,42$, при добавлении 5 мг/мл цеолита - $277,96 \pm 48,88$ ($p=0,007$), при добавлении 50 мг/мл - $177,98 \pm 14,06$ ($p=0,009$).

Таким образом, минералы атмосферных взвесей (на примере цеолитов Лютогского месторождения) при митогенстимулированной индукции изменяют продукцию цитокинов и проявляют дозозависимый эффект, что проявляется в снижении концентрации провоспалительного IL-1 β в 1,5 раза (5 мг/мл) и практически в 4 раза (50 мг/мл), а также в повышении содержания INF γ в 3 раза (5 мг/мл) и 2,5 раза (50 мг/мл) и IL-10 в 2,4 раза (5 мг/мл) и 1,5 раза (50 мг/мл). Таким образом, реакция системы иммунитета на минералы атмосферных взвесей показывает, что эти частицы можно рассматривать как антигены.

Ранее было показано (Кацнельсон и др., 1995; Полевченко, Федорущенко, 2004; Дорн, 2007; Дорн и др., 2008), что при хроническом производственном пылевом

воздействии возникает окислительный стресс, обуславливающий развитие воспалительно-деструктивных и аутоиммунных процессов в респираторной системе. Очевидно, что ответная реакция иммунной системы при многолетнем воздействии пыли и при влиянии частиц цеолитов на нейтрофилы *in vitro* имеют разные механизмы.

Как видно, при дозе 5 мг/мл (слабое «запыление») при митогенстимулированной индукции продукции цитокинов наблюдается яркая иммунная реакция, проявляющаяся в интенсивном росте $INF\gamma$ и менее выраженном росте $IL-1\beta$ и $IL-10$. Когда же «запыление» достигает 50 мг/мл, концентрация провоспалительного $IL-1\beta$ падает в 4 раза по сравнению с контролем. Это говорит о том, что организм позвоночных животных имеет механизм адаптации к повышению запыленности. Его пусковым «курком» является иммунная система, позволяющая интенсифицировать ответ на более высокий уровень запыленности.

* * *

В целом, можно отметить сходную ответную реакцию системы местного иммунитета дыхательных путей у крыс на ингаляционное введение цеолитов двух месторождений, рассматриваемых нами как компоненты природной атмосферной взвеси. Она проявляется в увеличении общего количества клеток (альвеолярных макрофагов и лимфоцитов), а при одновременном холодовом воздействии – в повышении жизнеспособности клеток, снижении их общего количества и нормализации соотношений популяций макрофагов и лимфоцитов. Следовательно, введение частиц цеолитов компенсирует негативное влияние низких температур.

Как было показано выше, минеральная пыль, являясь антигеном, вызывает ответ организма в виде усиленной миграции клеток, в частности, макрофагов, в легочную ткань, где последние активно фагоцитируют поступающие ксенобиотики. Во всех контрольных группах, где ингаляционно вводились цеолиты, нами отмечены случаи фагоцитоза. Это позволяет заключить, что минералы как бы «тренируют» систему местного иммунитета дыхательных путей, как и продукты жизнедеятельности микрофлоры кишечника стимулируют иммунитет ЖКТ, являясь постоянным источником антигенов. Данное наше предположение базируется на том, что иных постоянных источников антигенов в стерильных в норме терминальных отделах дыхательной системы не найдено.

Фагоцитируя частицы цеолитов, макрофаги вносят в свою внутреннюю среду неинертный материал. Цеолиты, особенно их водородные формы с высокой концентрации кислотных центров, проявляют выраженные каталитические свойства (Рабо, 1980; Herron, 1989; Fontes et al., 2002) и, видимо, макрофаги могут использовать их в своих метаболических процессах. О различии концентраций Лююисовских кислотных центров у разных цеолитов свидетельствуют данные табл. 3.

Табл. 3

Концентрация сильных и средней силы Лююисовских кислотных центров (ЛКЦ)
(связанных с Al^{3+}) для некоторых образцов цеолитов, мкмоль/г.

Месторождение	Частота CO, ν_{CO}	
	2198-2202 cm^{-1}	2225-2230 cm^{-1}
Лютогское	2	3
Вангинское	20	10

Как видно из табл. 3, цеолиты Вангинского месторождения обладают более высокой концентрацией Лююисовских кислотных центров, по сравнению с Лютогским. Они могут играть большую роль как в закреплении крупных биологических молекул, так и в превращениях любых органических субстратов. Отсюда следует, что частицы некоторых минералов могут катализировать внутриклеточные реакции, повышая функциональную активность фагоцитов.

4. Исследование токсичности частиц цеолитов (0,1-1 и 1-10 мкм) для животных

4.1. Влияние частиц цеолита (1-10 мкм) на антиоксидантную систему животных *in vivo*

Процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) является древней сигнальной внутриклеточной системой (Меньщикова и др., 2008). Влияние физических, химических или биологических факторов среды отражается на функциональном состоянии процессов ПОЛ и позволяет судить о силе и вредности по отношению к организму того или иного фактора. Антиоксидантная система (АОС) является регулятором каскадного процесса ПОЛ и способна его полностью прекратить. В связи с этим было целесообразно проверить ответную реакцию организма на частицы минералов, включив в определение как ПОЛ, так и АОС.

Для определения содержания продуктов ПОЛ и компонентов АОС в плазме крови и гомогенате легких беспородных крыс при ингаляционном введении частиц цеолитов (1-10 мкм) исследовались концентрации малонового диальдегида (МДА), диеновых конъюгатов, гидроперекисей липидов, появляющихся на разных стадиях процесса ПОЛ, а также витамина Е и церулоплазмينا, как стандартных веществ при медицинских исследованиях антиоксидантной активности.

В биохимическом анализе крови экспериментальных животных при сравнении групп “В” (Вангинское месторождение) и “К” (Контроль) наблюдается снижение количества диеновых конъюгатов в 2 раза и МДА на 24,6%, что может косвенно свидетельствовать об антиоксидантной активности цеолитов. В ткани легких происходит статистически не достоверное снижение концентрации церулоплазмينا – на 8,7% и витамина Е – на 7,3%. Последнее, возможно, объясняется местной воспалительной реакцией вследствие действия основного минерала цеолитового туфа Вангинского месторождения – клиноптилолита, при которой наблюдаются эффекты усиления ПОЛ и расходование компонентов АОС.

Сравнение данных биохимических исследований в группах животных “К”, “Х” и “ХВ” дало следующие результаты. В плазме крови крыс группы “ХВ” по сравнению с группой “Х” выявлено увеличение уровня церулоплазмينا на 22%, снижение количества диеновых конъюгатов на 32% и МДА на 31%, некоторая тенденция к уменьшению уровня гидроперекисей (на 14%) и увеличению концентрации витамина Е (на 16,4%). При этом содержание церулоплазмينا, диеновых конъюгатов и витамина Е в группе “ХВ” не отличалось достоверно от группы “К”.

В ткани легких у крыс группы “ХВ” по сравнению с группой “Х” наблюдается увеличение уровня церулоплазмينا на 22,6% и витамина Е - на 11,5% уменьшение диеновых конъюгатов на 16% и МДА - на 25%,. Все параметры достоверно приближались к контрольным значениям. Следовательно, наблюдается компенсирующее антиоксидантное действие цеолитов Вангинского месторождения при действии на организм животных низких температур, что в итоге ведет к повышению устойчивости клеток и их функциональной активности.

В биохимическом анализе крови группы “Кул” по сравнению “К” наблюдается увеличение количества диеновых конъюгатов в 1,5 раза и гидроперекисей на 22%, что может свидетельствовать о прооксидантной активности цеолитов Куликовского месторождения. В ткани легких происходит снижение концентрации церулоплазмينا (20%) и витамина Е (15%) и увеличение количества диеновых конъюгатов (20%) и гидроперекисей (15%). В ткани легких у крыс группы “ХКул” по сравнению с группой “Х” наблюдается уменьшение диеновых конъюгатов на 15% и гидроперекисей на 17%.

Следовательно, ингаляционное введение частиц цеолитов Куликовского месторождения (1-10 мкм) животным оказало небольшое прооксидантное действие, однако в сочетании с низкой температурой вызвало небольшой антиоксидантный эффект.

По данным Б. Момсильовича (Momcilovic, 1999), клиноптилолит превосходит витамины С и Е по оксидоредуктивному эффекту примерно в 200 раз. Данные исследований ряда ученых (Zarkovic et al., 2003; Sverko et al., 2004; Katic et al., 2006) говорят о том, что клиноптилолит оказывает выраженное защитное антиоксидантное и стимулирующее действие на культуру клеток.

Анти- или прооксидантные свойства цеолитов, по мнению С. Ивковича с соавторами (Ivkovich et al., 2004) и В. Сверко с соавторами (Sverko et al., 2004), зависят от их способности сорбировать активные формы кислорода и другие радикалы в поверхностных порах, т. е. минеральная поверхность выступает как простой сорбент. Методом ртутной порометрии при 77К (табл. 5) нами было показано, что у цеолитов Вангинского месторождения удельная поверхность мезопор в 2 раза больше, чем у цеолитов Куликовского месторождения. Если сравнивать оба вида цеолитов с активированным углем, как эталоном, имеющим удельную поверхность до 200 м²/г, то можно отметить их относительно высокую адсорбционную способность.

Таблица 5

Текстульные характеристики природных цеолитов Вангинского и Куликовского месторождений

Месторождение цеолита	Удельная поверхность, м ² /г		Объем микропор, см ³ /г
	по БЭТ*	мезопор	
Куликовское	27	17	0,005
Вангинское	56	43	0,006

* БЭТ - метод Брунауэра-Эммета-Теллера.

Как видно, для цеолитов Вангинского месторождения характерна более развитая удельная поверхность, чем для Куликовского, и соответственно более высокая сорбционная активность. Ионоселективные свойства цеолитов по отношению к жизненно важным (Na, Mg, Ca, K, Mn) и токсичным (F, Hg, Cd, Pb, Cs) катионам подтверждены многочисленными экспериментами (Кривова и др., 2001; Герасев, 2004; Гайдаш, 2005; Гаврилов, 2007; Гаглыева, 2008; Бгатова и др., 2009; и др.).

В целом, цеолиты чрезвычайно богаты химическими элементами и, в частности, в исследованных образцах цеолитов методами атомно-адсорбционной спектрофотометрии (ААС), нейтронно-активационного анализа (НАА) и рентгено-флуоресцентного анализа с синхротронным излучением (РФА-СИ) было обнаружено около 45 элементов. Следовательно, цеолиты можно рассматривать в качестве доноров большого количества жизненно важных микроэлементов.

Про- или антиоксидантные свойства цеолитовых туфов обусловлены также различием пороодообразующих минералов (Вангинское – клиноптилолит, имеющий пластинчатую структуру, Куликовское – морденит – игольчатую структуру). Поэтому можно полагать, что механическое повреждение клеток, проявляющееся в усилении ПОЛ, вызывается игольчатыми структурами цеолитов Куликовского месторождения. Это соотносится с мнением большого числа исследователей (Parker, 1994; Кацнельсон и др., 1995; Skinner, 2007; Дорн, 2007; Ilgren et al., 2008; Федорущенко, 2008; и др.), сообщающих о наличии прооксидантной активности у асбеста и эрионита – волокнистых минералов, схожих по строению с морденитом.

Следовательно, антиоксидантная или прооксидантная активность цеолитов обусловлена механохимическими и ионоселективными свойствами.

4.2. Влияние частиц кварца, полевого шпата и вулканического стекла (0,1-1 мкм) на антиоксидантную систему животных *in vitro*

В современной литературе имеется ряд публикаций, показывающих наличие у частиц некоторых минералов (кварца, асбеста, эрионита, морденита) прооксидантных свойств (Коркина, 1984; Дурнев и др., 1990, 1993; Даугель-Дауге и др., 2001; Ilgren et al., 2008). Преобладающим является мнение о том, что кварц, по которому сделано наибольшее число работ, стимулирует процессы перекисного окисления липидов с образованием большого количества активных форм кислорода, вызывая в итоге повреждение ДНК, ведущее к мутациям (Середенин, Дурнев, 1998).

Поскольку кварц является постоянным компонентом атмосферных взвесей, мы предположили, что он, а также полевой шпат и вулканическое стекло могут влиять на ПОЛ. Для этого было изучено влияние частиц этих минералов (0,1-1 мкм) на процессы перекисного окисления липидов *in vitro* в микросомах печени, в частности скорость ПОЛ и антиокислительная активность наночастиц минералов (АОАнм) (табл. 5).

Таблица 5

Влияние наночастиц минералов в концентрации 10 мг/мл инкубационной смеси на скорость аскорбат-зависимого ПОЛ в микросомах печени

	Микросомы	Микросомы + α -кварц	Микросомы + полевой шпат	Микросомы + вулк. стекло
Скорость ПОЛ*	3,1 $\pm$ 0,24	1,8 $\pm$ 0,11	2,5 $\pm$ 0,15	2,1 $\pm$ 0,1
АОАнм (%)		41	19	33

* нмоль МДА мин⁻¹ мг⁻¹ белка микросом

Как видно, наибольший антиоксидантный эффект (41%) оказывал α -кварц, наименьший (19%) - полевой шпат.

Аналогичный эффект оказывают наночастицы минералов на ферментативное НАДФН-зависимое ПОЛ в суспензии микросом (табл. 6).

Таблица 6

Влияние наноминералов на скорость НАДФН -зависимого ПОЛ в микросомах печени

	Микросомы	Микросомы+ α -кварц	Микросомы + полевой шпат	Микросомы + вулк. стекло
Скорость ПОЛ	0,26 $\pm$ 0,016	0,09 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,013	0,18 $\pm$ 0,015
АОАнм (%)		65	7	30

Как и в случае с аскорбат-зависимым ПОЛ, антиоксидантный эффект при НАДФН-зависимом ПОЛ также сильнее всего выражен у α -кварца (65%), меньше - у вулканического стекла (30%) и еще меньше (7%) - у полевого шпата.

Для изучения дозозависимого эффекта исследовалось влияние α -кварца на скорость аскорбат-зависимого ПОЛ в микросомах печени (табл. 7).

Таблица 7

Эффект влияния α -кварца на скорость аскорбат-зависимого ПОЛ в микросомах печени в зависимости от дозы

	Микросомы	Микросомы + α -кварц (1 мг/мл)	Микросомы + α -кварц (5 мг/мл)	Микросомы + α -кварц (10 мг/мл)	Микросомы + α -кварц (50 мг/мл)
Скорость ПОЛ	2,21 $\pm$ 0,17	2,17 $\pm$ 0,016	1,40 $\pm$ 0,011	0,84 $\pm$ 0,091	0,33 $\pm$ 0,039

АОАнм (%)		2	37	62	85
-----------	--	---	----	----	----

Как можно видеть, при увеличении концентрации α -кварца в инкубационной смеси с 1 до 50 мг/мл скорость ПОЛ снизилась от 2,17 до 0,33 нмоль МДА мин⁻¹ мг⁻¹ белка микросом, а антиоксидантный эффект увеличился с 2 до 85%.

Таким образом, при исследовании влияния α -кварца, полевого шпата и вулканического стекла на ПОЛ в микросомах печени крыс *in vitro* наночастицы всех трёх минералов оказывают антиоксидантный эффект как при неферментативном, так и при ферментативном ПОЛ. Сильнее всего эффект выражен у α -кварца, меньше всего - у полевого шпата.

На первый взгляд, установленный нами антиоксидантный эффект наночастиц минералов, и особенно α -кварца, при ПОЛ в микросомах печени представляется весьма неожиданным, и объяснить его механизм затруднительно. Вряд ли использованные минералы обладают восстанавливающими свойствами и являются истинными антиоксидантами, т. е. ловушками свободных радикалов.

Возможно, причиной эффекта является сорбция минералами каких-либо компонентов, необходимых для протекания процесса ПОЛ, например ионов Fe^{2+} . Мы проверили это предположение, изучив способность минералов сорбировать ионы Fe^{2+} .

Для исследования сорбции ионов Fe^{2+} использованными в работе минералами был разработан метод количественного определения ионов двухвалентного железа по реакции с $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN}_6)]$. При относительно низких концентрациях ионов Fe^{2+} и $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN}_6)]$ осадка берлинской лазури не образуется, и реакция сопровождается лишь развитием синеголубового окрашивания с максимумом светопоглощения при 693 нм. Спектр поглощения цветного продукта не перекрывается с пиком поглощения $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN}_6)]$, максимум которого отмечается при 420 нм. Используемая нами концентрация $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN}_6)]$ составляла 50 мг/100 мл. Объем инкубационной смеси 3 мл. Линейная зависимость интенсивности развивающейся окраски от количества вносимого Fe^{2+} отмечается в диапазоне его концентраций от 20 до 180 нмоль (рис. 3). По калибровочному графику рассчитан коэффициент молярной экстинкции образующегося цветного комплекса - 7150 ед ОП М⁻¹ см⁻¹.

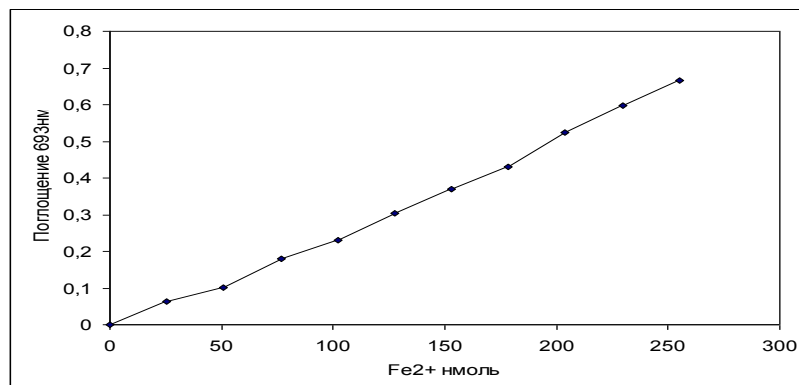


Рис. 3. Калибровочный график для определения ионов Fe^{2+} по цветной реакции с $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN}_6)]$.

Первоначально для исследования сорбции ионов Fe^{2+} бралось 100 мг минералов. Как видно из результатов, представленных в табл. 8, в выбранных экспериментальных условиях полевой шпат сорбировал практически все железо, вулканическое стекло - 98% железа, а α -кварц - только 28%.

Таблица 8

Сорбция ионов Fe^{2+} частицами минералов (100 мг)				
	Исходный раствор ионов Fe^{2+}	α -кварц	полевой шпат	Вулк. стекло

Нмоль Fe^{2+} в растворе	100	72	1	8
Сорбировано Fe^{2+} (нмоль)	-	28	99	92
% сорбции		28	99	92

При исследовании сорбции ионов Fe^{2+} различными количествами полевого шпата (10 – 50 мг) установлено, что она возрастает с увеличением количества минерала (табл. 9).

Таблица 9

Зависимость сорбции ионов Fe^{2+} полевым шпатом от количества наноминерала

	Исходный раствор ионов Fe^{2+}	Полевой шпат				
		10 мг	20 мг	30 мг	40 мг	50 мг
нмоль Fe^{2+} в растворе	120	106	105	84	71	55
Сорбировано Fe^{2+} (нмоль)	-	14	15	36	49	65
% сорбции	-	12	13	30	41	54
Сорбировано Fe^{2+} (нмоль/ мг наноминерала)	-	0	0	1,2	1,23	1,3

Таким образом, исследованные минералы способны сорбировать ионы Fe^{2+} , и это согласуется с их антиоксидантным эффектом при ПОЛ в микросомах печени. Однако прямой зависимости между выраженностью антиоксидантного эффекта минерала и его способностью к сорбции Fe^{2+} не выявлено. Так, α -кварц оказывает наиболее выраженный антиоксидантный эффект и обладает наименьшими сорбционными свойствами. Из трех исследованных минералов полевой шпат наиболее эффективно сорбирует Fe^{2+} и проявляет наименьший антиоксидантный эффект. Следовательно, выявленные антиоксидантные свойства минералов при ПОЛ в микросомах печени не обусловлены только их способностью сорбировать ионы железа.

Суммируя вышесказанное, можно предположить, что расхождение литературных данных по вопросу о наличии антиоксидантных или прооксидантных свойств у различных минералов, и, в частности, кварца, объясняется тем, что в разных экспериментах были взяты частицы минералов с разными размерами и различными физико-химическими характеристиками.

4.3. Оценка токсичности частиц минералов размером 1-10 мкм *in vivo*

Для полноты информации о действии частиц минералов атмосферных взвесей на лабораторных животных мы изучили также морфологические параметры строения легких, печени и почек. В данном эксперименте исследовались цеолиты только Вангинского месторождения. Отмечено, что у животных в группе «К» тучные клетки (лаброциты) чаще всего обнаруживаются в перибронхиальной соединительной ткани или в адвентиции бронхов. В группе «Х» лаброциты в большом количестве мигрируют в эпителий. У животных, подвергаемых действию низких температур, снижаются практически все морфометрические параметры клеточных элементов, что наблюдалось и другими авторами (Целуйко, 1993; Хаснулин, 1998; Луценко, 2006). В группе «В» морфометрические параметры клеток достоверно не отличается от контрольных значений, а в группе «ХВ» - приближаются к контрольным (табл. 10).

Морфометрические показатели лаброцитов каудального бронха в разных экспериментальных группах животных

Группы/показатели	К	Х	В	ХВ
Периметр, мкм	22,42±0,55	19,76±0,43	23,35±0,56	21,02±0,45
Площадь, мкм ²	28,77±0,89	20,65±0,44	29,32±0,93	26,26±0,80
Ширина, мкм	4,51±0,31	3,53±0,19	4,62±0,30	4,23±0,27
Длина, мкм	8,54±0,32	7,88±0,30	8,62±0,37	8,19±0,31
Округлость, ед	2,4±0,08	2,0±0,05	2,3±0,07	2,4±0,09
Число гранул в тучной клетке, шт	85,2±2,54	80,9±2,31	89,1±2,64	82,1±2,42
Число тучных клеток в эпителии, шт	1,0±0,20	2,8±0,69	1,4±0,31	1,7±0,30

В группе «В» в морфологическом строении респираторного отдела легких и отдельных клеток достоверных отличий от группы «К» не обнаружено, однако в большом количестве наблюдались макрофаги с многочисленными фагосомами, в которых предположительно находится цеолит.

В печени крыс в группе «Х» обнаружены очаги вакуолизации гепатоцитов и случаи пикноза ядер, хотя, в целом, гистологическое строение печени близко к контролю. Контакты между гепатоцитами в группе «Х» расширены по сравнению с контрольными. Скорее всего, это свидетельствует о нарушении обменных, энергетических и пластических процессов в паренхиме печени вследствие синдрома гиперлипидпероксидации. Гистологические параметры печени крыс группы «В» находились в пределах контрольных значений. Однако в этой группе наблюдалось достоверное повышение процента двуядерных гепатоцитов по сравнению с группами «К» и «Х». В цитоплазме отдельных гепатоцитов и клеток Купфера в группе «В» и «ХВ» имеются фагосомы. Морфологической картины токсического повреждения ткани печени цеолитом Вангинского месторождения на уровне световой микроскопии при увеличении (до 480 раз) не обнаружено.

В структуре почек в группе «Х» наблюдается повышенная вакуолизация эпителиоцитов, диаметр собирательных трубочек и проксимальных канальцев уменьшается по сравнению с нормой. У подоцитов животных в группе «Х» сморщиваются ядра, хроматин конденсирован, цитоплазма содержит вакуоли. Эти данные говорят о функциональном напряжении мочевыводящей системы вследствие повышенного содержания в крови продуктов перекисного окисления липидов. Гистологическое строение почек в группах «В» и «ХВ» близко к контрольным значениям.

Лишь в группе «В» наблюдалось увеличение некоторых морфометрических параметров эпителиоцитов и количества фагосом в мезангиоцитах по сравнению с контролем. Токсического действия цеолитов на структуру почек нами не обнаружено.

Очевидно, цеолиты Вангинского месторождения (1-10 мкм) не оказывают выраженного токсического действия при ингаляционном введении в организм, при охлаждении же организма – еще и нормализуют большинство морфометрических параметров, в отличие от асбеста и эрионита, которые, кроме пульмоксичности, могут вызвать системные нарушения (опухоли, гастропатии, аутоиммунные нарушения и др.) (Carbone et al., 2002; Дорн, 2007; Федорущенко, 2008).

Кроме того, цеолиты, применяемые в эксперименте, при воздействии холода на животных проявили индуцирующее влияние на регенераторные свойства гепатоцитов.

4.4. Оценка токсичности частиц минералов (0,1-1 мкм) *in vivo*

Как известно, наиболее опасные с точки зрения влияния на организмы, частицы взвесей менее 1 мкм обычно проходят через дыхательные пути транзитивно и не оседают в ткани легких (Skinner, 2005; Юшкин, 2007; Чучалин, 2008). Для исследования

токсичности минералов с размером частиц от 100 нм до 1 мкм нами было предложено пероральное введение цеолита лабораторным животным.

Морфометрия эпителиоцитов почечных канальцев в группах животных с механическим и ультразвуковым измельчениями цеолитов не выявила достоверных изменений по сравнению с нормой. Выраженные изменения в паренхиме почек наблюдаются в группах с измельчением цеолитов в планетарной мельнице до нанодиапозона (рис. 4А и Б).

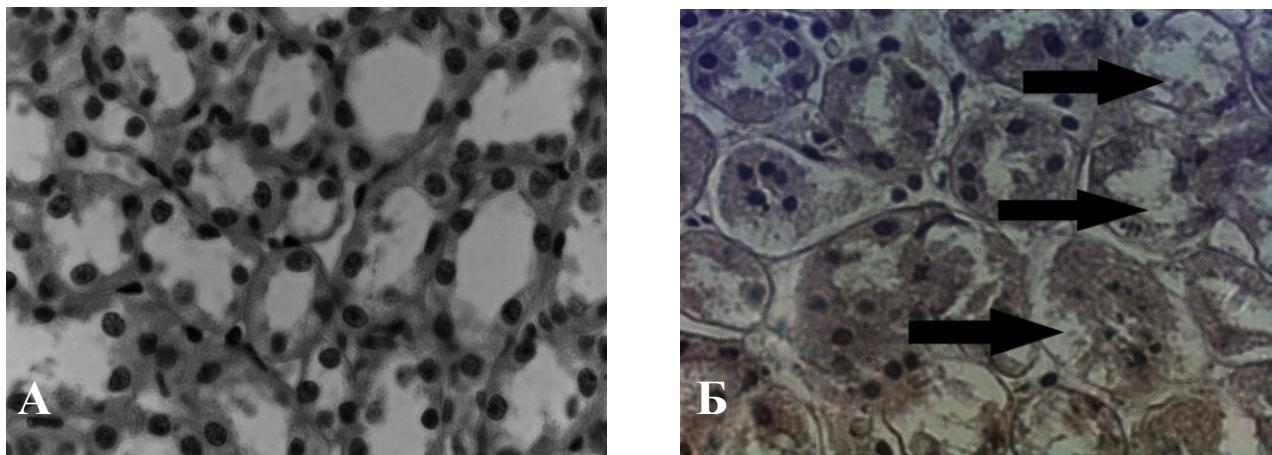


Рис. 4. Гистологическое строение паренхимы почек. Увеличение $\times 1000$. А. Группа "Контроль". Б. Группа "Шивертуй-н".

Как видно на рис. 4, в структуре почек в группе «Шивертуй-н» наблюдаются некротические изменения (указано стрелками) и повышенная вакуолизация эпителиоцитов по сравнению с контролем.

Заметим, что в паренхиме почек при введении наночастиц цеолитов Шивертуйского месторождения обнаружены также формирующиеся конкременты неустоановленного состава. Можно думать, что нам удалось зафиксировать стадии процесса формирования органоминерального агрегата (рис. 5А и Б).

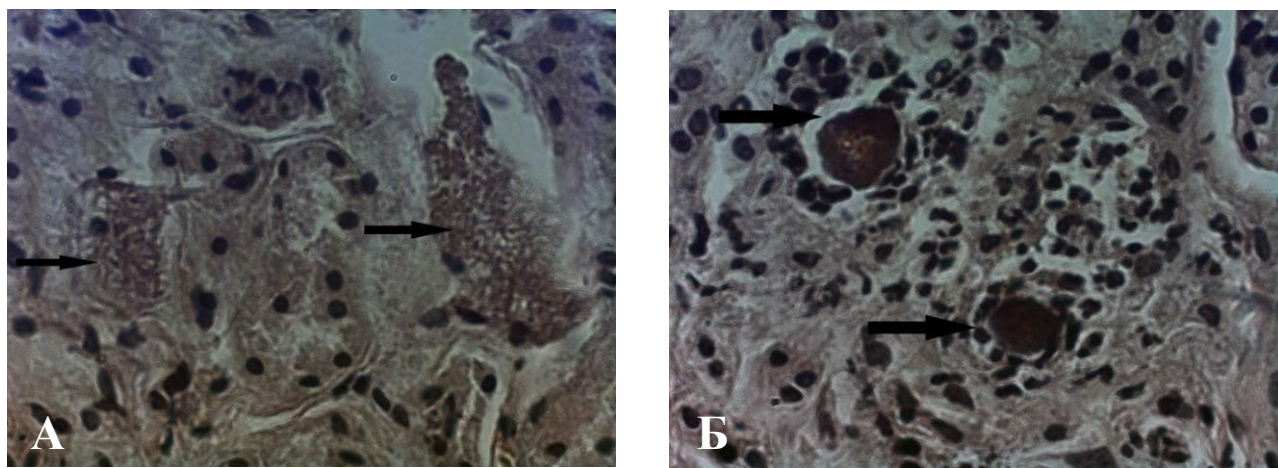


Рис. 5. Гистологическое строение паренхимы почек при введении частиц цеолитов Шивертуйского месторождения в нанодиапозоне. Увеличение $\times 1000$.

А. Стадия начального образования органоминерального агрегата (показано стрелками).

Б. Сформировавшиеся конкременты (показано стрелками)

На рис. 5А видны кристаллические структуры с выраженной абиогенной геометрией. По-видимому, два агрегата, указанные стрелками на рис. 5Б, имеющие размеры 16,52 и 14,73 мкм, образовались *in situ*.

Морфометрические параметры эпителиоцитов почечных канальцев в экспериментальных группах приводятся в таблице 11.

Таблица 11

Морфометрические параметры эпителиоцитов почечных канальцев в разных экспериментальных группах

Группа/ параметр	Длина ядра, мкм	Ширина ядра, мкм	Площадь ядра, мкм ²	Длина клетки, мкм	Ширина клетки, мкм	Площадь клетки, мкм ²
Контроль	4,92±0,41	5,34±0,52	20,75±2,26	8,99±0,97	10,16±0,82	80,25±5,43
Шивертуй-н	3,99±0,25	3,23±0,36	14,14±1,54	8,34±0,77	7,44±0,87	66,67±6,23
Люльин-н	3,87±0,12	3,73±0,23	11,98±1,24	10,82±1,09	9,23±0,86	72,29±4,44
Куликов-н	4,03±0,37	3,36±0,28	13,59±1,22	7,22±0,68	7,38±0,73	54,16±4,67
Вангин-н	4,92±0,33	4,35±0,32	19,65±2,21	8,57±0,82	9,78±0,77	73,34±4,12
Холин-н	4,66±0,32	3,14±0,27	12,96±1,44	9,26±0,87	6,63±0,54	58,68±3,98

Данные морфометрии говорят о токсическом поражении мочевыводящей системы вследствие прямого действия наночастиц минералов всех месторождений. По-видимому, это происходит из-за повышенного накопления активных форм кислорода на поверхности наночастиц, которые приводят к усилению каскада ПОЛ.

Отметим также, что в паренхиме почек нами были обнаружены и свободно лежащие наночастицы цеолитов (рис. 6А и Б), которые, видимо, проникают через гломерулярный барьер.

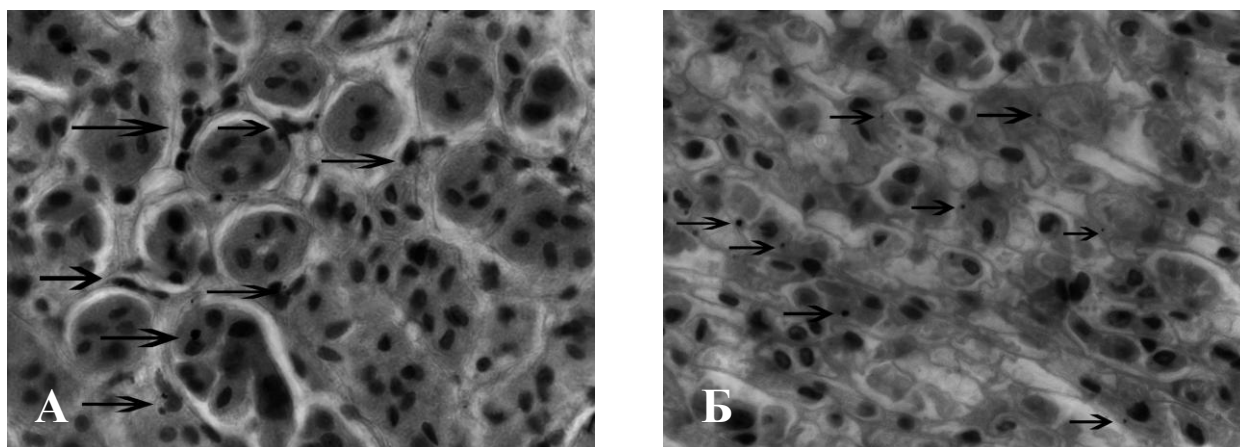


Рис. 6. Гистологическое строение паренхимы почек при введении частиц цеолитов разных месторождений в нанодиапозоне. Увеличение x1000

А) Наночастицы цеолитов (отмечены стрелками) Люльинского месторождения.

Б) Наночастицы цеолитов Холинского месторождения (отмечены стрелками). Видны некротические изменения ткани.

Средние размеры, обнаруженных в паренхиме почек частиц цеолитов составляют 0,2-2,5 мкм. По данным морфометрии, наночастицы цеолитов Куликовского и Холинского месторождений показали наибольшую токсичность (некрозы на рис. 5Б), а наночастицы Люльинского месторождения - наименьшую. Образцы наночастиц минералов Вангинского и Шивертуйского месторождений были умеренно токсичны.

Таким образом, наиболее реакционной активностью обладают частицы цеолитов в нанодиапозоне. Судя по полученным результатам, размер частиц обратно пропорционален

токсическому действию (чем мельче, тем токсичнее). Выявленные свойства частиц цеолита можно объяснить меняющимися при измельчении физико-химическими свойствами, в частности, изменением на поверхности кристаллической решетки электрического заряда, который при измельчении до нанодиапозона возрастает до критических значений. Это согласуется с результатами большинства нанотоксикологических исследований (Service, 2003; Shvedova et al., 2003; Li et al., 2007; Sharma et al., 2007; Smith et al., 2007; Yacobi et al., 2007; Бгатова и др., 2008; Дурнев, 2008). Полагают, что наночастицы водонерастворимых материалов токсичны, вызывают апоптоз клеток, проявляют мутагенные свойства вследствие усиления образования активных форм кислорода. Причем токсичность этих материалов может зависеть от линейных размеров, химической природы и наличия примесей.

Очевидно, что наночастицы цеолитов обладают токсическим действием, в отличие от микрочастиц цеолитов, и у минералов разных месторождений токсичность выражена в разной степени.

4.5. Влияние минералов (0,1-1 мкм) на агрегацию тромбоцитов человека *in vitro*

Агрегация тромбоцитов выбрана в качестве модели для изучения возможного токсического влияния минералов на нормальные биохимические процессы при межклеточных взаимодействиях. Показано, что частицы полевого шпата, α -кварца, вулканического стекла и апатита препятствуют агрегации тромбоцитов. Максимальный уровень агрегации по сравнению с контрольными значениями достоверно снизился (на 10-17% от контроля) в присутствии всех исследуемых минералов. При пересчете значений полученных показателей агрегации на абсолютные проценты видно, что суспензии минералов практически равноценны в снижении уровня агрегации тромбоцитов: вулканическое стекло – на 25,6%, кварц – на 23,5%, апатит – на 21,3%, полевого шпат – на 18,1%.

Возможно, что антиагрегационные свойства измельченных минералов обусловлены их сорбционной способностью, а также электростатическими взаимодействиями с мембраной тромбоцитов. Так, самому высокому дзета-потенциалу у вулканического стекла соответствует и самая высокая антиагрегирующая способность (табл. 15). Однако самому низкому потенциалу апатита соответствует не наименьшая антиагрегирующая способность. Следовательно, электрокинетический заряд является не единственной причиной антиагрегационного влияния минералов.

Можно думать, что возможными причинами подавления агрегации является сорбция АДФ на минеральных частицах. Для проверки этой рабочей гипотезы мы исследовали сорбцию АДФ минералами, и выяснили, что концентрация АДФ в растворе при добавлении последовательно всех минералов снижалась в среднем на 4,8-7,2%. Следовательно, сорбционная активность составляет около 2,5-3,5 мкМ АДФ на 1 мг минеральных частиц. Учитывая тот факт, что для максимальной агрегации тромбоцитов требуется 20 мкМ АДФ, можно рассчитать концентрацию минералов, необходимую для предотвращения агрегации – около 7-8 мг.

Таким образом, антиагрегационные свойства минералов обусловлены сочетанным действием поверхностного дзета-потенциала и сорбции АДФ.

5. Влияние частиц минералов (0,1-1 мкм и 1-10 мкм) на микроорганизмы *E. coli* и *St. aureus*

Антибактериальные свойства цеолитов Вангинского, Куликовского и Лютогского месторождений, кварца, полевого шпата и вулканического стекла с разной степенью измельчения (от 0,1 до 1 мкм; от 1 до 10 мкм) исследованы с применением стандартных

культур *E. coli* 25922 и *St. aureus* 209-Р. Подбирая разведения, мы остановились на 10^{-4} и 10^{-3} , как на наиболее наглядных концентрациях микроорганизмов (табл. 12).

Таблица 12

Влияние цеолита Вангинского месторождения (1-10 мкм) без термообработки на рост *St. aureus* 906, в КОЕ (среда ЖСА)

Концентрация / Разведение	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
Контроль	Роста нет	$0,53 \times 10^2$	$1,1 \times 10^3$	2×10^3	3×10^4
10 мг/мл	Роста нет	$1,4 \times 10^2$	2×10^2	$2,5 \times 10^2$	8×10^3
20 мг/мл	Роста нет	$0,5 \times 10^2$	$0,22 \times 10^2$	$0,32 \times 10^2$	$0,41 \times 10^2$
50 мг/мл	Роста нет	Роста нет	$0,7 \times 10^2$	$0,17 \times 10^2$	10

При добавлении цеолитов, как с термообработкой, так и без неё, мы получили данные, представленные в табл. 13 и 14. Термообработка (паром при температуре 120°C в течение 1 ч) применялась для стерилизации образцов цеолитов.

Таблица 13

Влияние цеолита Куликовского месторождения (1-10 мкм) на рост *St. aureus* 906, в КОЕ (среда ЖСА)

Концентрация / Разведение	С термообработкой		Без термообработки	
	10^{-4}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-3}
Контроль	$4,2 \times 10^2$	$2,8 \times 10^3$	$4,2 \times 10^2$	$2,8 \times 10^3$
10 мг/мл	$0,5 \times 10^2$	5×10^2	$1,5 \times 10^2$	$1,9 \times 10^3$
20 мг/мл	$0,58 \times 10^2$	$8,4 \times 10^2$	$0,06 \times 10^2$	$5,4 \times 10^2$
50 мг/мл	$1,26 \times 10^3$	$2,2 \times 10^3$	Роста нет	$2,2 \times 10^2$

Как видно, цеолит Куликовского месторождения без термообработки обладает небольшим антибактериальным действием. В то же время, при воздействии это же цеолита, как с термообработкой, так и без неё, на рост *E. coli* 25922 выявлен бактериостимулирующий эффект во всех разведениях и концентрациях (число КОЕ не поддавалось подсчёту).

Цеолит Лютогского месторождения (как с термообработкой, так и без неё) полностью подавлял рост *St. aureus* 209-Р в разведениях от 10^{-6} до 10^{-3} . Результаты воздействия цеолита Лютогского месторождения на *E. coli* показаны в табл. 14.

Таблица 14

Влияние цеолита Лютогского месторождения (1-10 мкм) на рост *E. coli* 25922, в КОЕ (среда МПА)

Концентрация / Разведение	С термообработкой		Без термообработки	
	10^{-4}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-3}
Контроль	8×10^2	$5,2 \times 10^3$	8×10^2	$5,2 \times 10^3$
10 мг/мл	$9,7 \times 10^2$	$1,8 \times 10^3$	Роста нет	$0,57 \times 10^2$
20 мг/мл	$1,4 \times 10^2$	$9,2 \times 10^2$	Роста нет	$0,3 \times 10^2$
50 мг/мл	$1,2 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$	Роста нет	Роста нет

Как видно, и в этом случае, цеолит без термообработки проявляет антибактериальное действие, в отличие от обработанного.

Таким образом, цеолиты Вангинского и Лютогского месторождений, в отличие от Куликовского, обладают выраженным антибактериальным эффектом при размере частиц от 1 до 10 мкм в отношении *St. aureus* 209-Р и 906, а также - *E. coli* 25922.

Для выявления антибактериальных свойств у частиц цеолитов с размерами нанодиапозона, все минералы были измельчены в планетарной мельнице до размеров 0,1-1 мкм. Наночастицы цеолитов Вангинского, Куликовского и Лютогского месторождений антимикробной активностью не обладали. Скорее всего, это происходит из-за отсутствия сорбции бактерий на поверхности цеолита, вследствие которой падают его антимикробные свойства. Это возможно связано с резким уменьшением поверхности контакта бактерий с субстратом и изменением его физико-химических свойств.

Следовательно, антимикробная активность цеолитов зависит от величины частиц и, по-видимому, меняющихся при этом физико-химических свойств цеолитов.

Возможным объяснением антимикробной активности минералов является наличие в них нано- и микрочастиц серебра и других металлов. Так, в образцах цеолитов Ванчинского месторождения обнаружены микрочастицы природного сплава (тройной системы) Au-Cu-Ag, что, по-видимому, обусловлено «заражением» цеолитовых туфов промывными водами золотосеребряного месторождения Союзное, расположенного на юго-восточном фланге Ванчинской впадины. Найденные микрочастицы Au-Cu-Ag имеют размеры от 500 нм до 3 мкм (рис. 7А и Б). Состав обнаруженных частиц незначительно варьирует, и в среднем составляет (в масс. %): Au - 60, Cu – 30, Ag – 10. Помимо природного сплава Au-Cu-Ag в цеолититах обнаружены отдельные микрочастицы самородного золота, серебра и хрома (Чекрыжов, Голохваст и др., 2011).

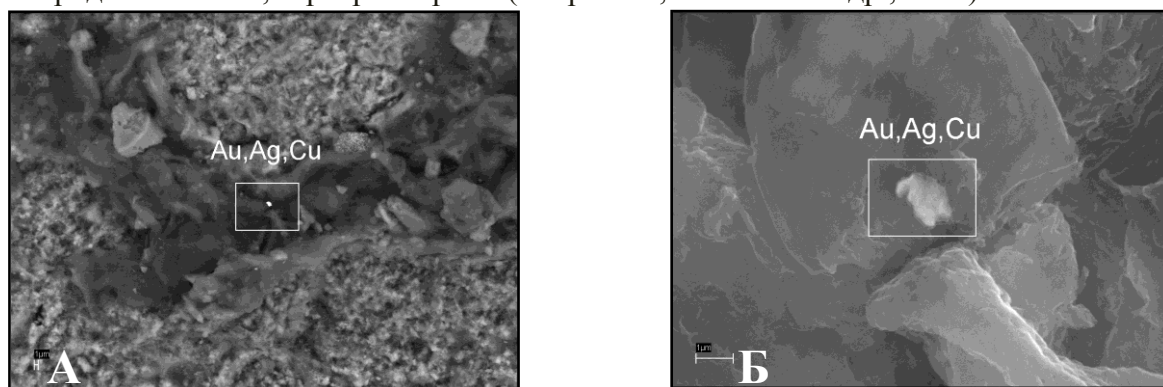


Рис. 7. Микроснимок частицы природного сплава Au-Cu-Ag, выполненный при помощи сканирующего электронного микроскопа ZEISS EVO 50 XVP: А. В отраженных электронах (увеличение 2 000 раз); Б. Во вторичных электронах (увеличение 20 000 раз).

Частицы (от 100 нм до 1 мкм) других типичных компонентов атмосферных взвесей: кварца, полевого шпата и вулканического стекла, антимикробной активностью по отношению к *E. coli* не обладали.

Наличие или отсутствие антибактериальных свойств у минералов, по мнению Кубота с соавторами (Kubota et al., 2008), можно объяснить наличием на поверхности кристаллической решетки специфического электрического заряда, однако найти достоверные отличия и корреляцию между величиной заряда и антимикробной активности нам не удалось (табл. 15).

Табл. 15

Исследование дзета-потенциала (ζ -потенциала) частиц минералов

Образец	Антимикробная активность	ζ -потенциал, мВ
Полевой шпат	-	-28 $\pm$ 5
Кварц α	-	-27 $\pm$ 2
Вулканическое стекло	-	-36 $\pm$ 1
Апатит	не исследовалась	-7,1 $\pm$ 0,6
Цеолит Вангинского месторождения	+++	-32 $\pm$ 3
Цеолит Лютогского месторождения	++	-33 $\pm$ 3

Можно предположить, что на поверхности минералов присутствуют какие-то бактерии или их споры, которые могут подавлять рост других прокариот. Однако предпринятая нами попытка посеять природные цеолиты в концентрациях 10, 20 и 50 мг/мл на среды Эндо и МПА показала, что роста колоний не происходит.

Натурные наблюдения по влиянию минералов на рост бактерий, позволили установить проявление бактериостимулирующей или бактериостатической активности, что было также отмечено рядом авторов (Звягинцев, 1973; Паничев, 1990; Чубенко, 2000; Шурубикова, 2004; Заварзин, 2008; Наймарк и др., 2009).

Следовательно, механизм влияния частиц минералов на бактерии обусловлен контактом с поверхностью (адгезия бактерий), а при бактериостатическом действии - наличием частиц Ag, Cu, Au.

Выводы

1) Основными минеральными видами природных атмосферных взвесей города-порта Владивостока являются алюмосиликаты (полевоы шпат, плагиоклазы, глинистые минералы, вулканические стекла) и кварцы.

2) Атмосферные взвеси имеют 5 размерных классов: 1) 0,1-1 мкм, 2) 1-10 мкм, 3) 10-50 мкм, 4) 50-100 мкм, 5) от 100 мкм и более, из которых особенно пристального внимания с точки зрения влияния на здоровье требуют первые две фракции. Токсичность частиц этих фракций обуславливается малым диаметром и крайне развитой удельной поверхностью (до $15775 \text{ см}^2/\text{г}$ и $31550 \text{ см}^2/\text{см}^3$), способной сорбировать ксенобиотики.

3) Проведено первичное экологическое районирование г. Владивостока по содержанию нано- и микрочастиц атмосферных взвесей. По степени экологической опасности районы города Владивостока выстраиваются по убыванию в следующий ряд: Первая речка, п-ов Шкота, Вторая речка, Пушкинская, Садгород и пос. Емар.

4) Для оценки биологической активности основных компонентов атмосферных взвесей построена экспериментальная модель. Её суть состоит в имитации состава природных компонентов атмосферных взвесей минералами коры выветривания данного региона, и пути поступления (ингаляторно) в организм животных.

5) Частицы природных минералов атмосферных взвесей с размерами от 1 до 10 мкм при ингаляционном поступлении не проявляют токсичных свойств по отношению к исследованным мишеням - ткани легких, системе местного иммунитета дыхательных путей, почкам, печени крыс.

6) Ответная реакция системы местного иммунитета дыхательных путей на воздействие минеральных частиц при ингаляционном поступлении проявляется в увеличении общего количества клеток (альвеолярных макрофагов и лимфоцитов), изменении жизнеспособности и соотношения клеточных популяций и зависит от природы и физико-химических свойств порообразующего минерала.

7) Ответная реакция системы местного иммунитета при одновременном действии низкой температуры и ингаляционном введении частиц минералов проявляется в снижении общего числа клеток, повышении их жизнеспособности, нормализации морфометрических параметров и соотношения клеточных типов.

8) Механизм действия частиц минералов на систему местного иммунитета дыхательных путей обусловлен проявлением ими антигенных свойств. Так, частицы цеолитов Лютогского месторождения проявляют иммуностимулирующие свойства *in vitro* в дозировках 5 и 50 мг/мл, выявляющиеся в усилении спонтанной индукции гамма-интерферона в 1,6 раза, а также интерлейкина-1 β и интерлейкина-10 в 2 раза.

9) Частицы цеолитов (1-10 мкм) Лютогского месторождения при митогенстимулированной индукции цитокинов проявляют дозозависимый эффект. Так, при дозе 5 мг/мл (слабое «запыление») наблюдается выраженная иммунная реакция,

проявляющаяся в интенсивном росте гамма-интерферона и менее выраженном росте интерлейкинов. При большем «запылении» (50 мг/мл) меняется профиль продукции цитокинов - интенсивно снижается концентрация провоспалительного IL-1 β (в 4 раза по сравнению с контролем) и незначительно повышается содержание гамма-интерферона и IL-10, т.е. иммунная система, меняет ответ на более высокий уровень запыленности.

10) Частицы цеолитов размером 1-10 мкм при ингаляционном введении не оказывают токсического действия на ткань легкого, почек и печени, но при меньших размерах (0,1-1 мкм) при пероральном введении являются токсичными по отношению к ткани почек, что проявляется в некротических процессах.

11) В зависимости от типа минералов, их микрочастицы (1-10 мкм) могут вызывать разные ответные реакции, проявляя как антиоксидантное (Вангинское месторождение), так и прооксидантное (Куликовское месторождение) действие *in vivo*. Частицы кварца, полевого шпата и вулканического стекла с размером 0,1-1 мкм проявляют *in vitro* антиоксидантные свойства, имеющие дозозависимый эффект.

12) Частицы кварца, полевого шпата, вулканического стекла влияют на межклеточные взаимодействия, изученные на примере агрегации тромбоцитов, что проявляется в снижении агрегантности на 18-25%. Антиагрегантным механизмом является совместное действие поверхностного заряда и сорбция АДФ как 12-го тромбоцитарного фактора свертывания крови.

13) Частицы цеолитов с размером 1-10 мкм могут проявлять как бактериостатические (Лютоское и Вангинское месторождения), так и бактериостимулирующие (Куликовское месторождение) свойства, которые практически исчезают при меньших размерах (0,1-1 мкм). Это связано с резким уменьшением поверхности контакта бактерий с частицами минералов и изменением их физико-химических свойств. Кварц, полевой шпат, вулканическое стекло с размером частиц 0,1-1 мкм не проявляют ни бактериостатических, ни бактериостимулирующих свойств.

Список наиболее важных публикаций по теме диссертации

Монография

1. Голохваст К.С. Взаимодействие организмов с минералами. Владивосток: Изд-во ДВГТУ, 2010. 115с.

Публикации в журналах, рекомендованных ВАК РФ:

2. Голохваст К.С. О возможных клеточных рецепторах к неорганическим кристаллическим лигандам // **Журнал научных публикаций аспирантов и докторантов**, 2007. № 12. С. 122-123.
3. Голохваст К.С., Паничев А.М. О протекторном действии цеолитов на систему местного иммунитета дыхательных путей // **Вестник новых медицинских технологий**, 2008. Т.ХV. №2. С. 217-218.
4. Голохваст К.С., Паничев А.М., Гульков А.Н. Использование цеолитов в медицине и ветеринарии // **Вестник ДВО РАН**, 2008. №3. С. 71-75.
5. Голохваст К.С., Паничев А.М., Борисов С.Ю. Возможная роль минералов в стимуляции иммунитета дыхательных путей // **Российский иммунологический журнал**, 2008. Т.2 (11). № 2-3. С.191.
6. Голохваст К.С., Паничев А.М., Гульков А.Н., Мишаков И.В., Ведягин А.А. Антиоксидантные и иммуномодулирующие свойства природных цеолитов // **Тихоокеанский медицинский журнал**, 2009. №3. С. 68-70.
7. Голохваст К.С., Паничев А.М., Гульков А.Н., Мишаков И.В., Ведягин А.А. Иммунные свойства природных нанокompозитных алюмосиликатов // **Российский аллергологический журнал**, 2009. №3, вып. 1. С. 233-234.
8. Голохваст К.С., Паничев А.М., Гульков А.Н., Анисимова А.А. Перспективы биомедицинского использования природных минералов // **Известия Самарского научного центра РАН**, 2009. Т.11, №1(2). С. 208-211.
9. Голохваст К.С. Изучение потенциальных фармакологических свойств цеолитов // **Клиническая фармакология и терапия**, 2009. №6. С. 265-266.
10. Голохваст К.С., Паничев А.М., Гульков А.Н., Никифоров П.А., Федотова И.Г., Анисимова А.А., Памирский И.Э., Автомонов Е.Г. Токсикологические и антимикробные свойства минеральных наночастиц // **Известия Самарского научного центра РАН**, 2009. Т.11, №5(2). С. 448-451.

11. Голохваст К.С., Паничев А.М., Гульков А.Н., Автомонов Е.Г., Мишаков И.В., Ведягин А.А. Экспериментальная модель для экологической оценки влияния цеолитовой пыли и низкоэнергетического лазерного воздействия на живые объекты // **Горный информационно-аналитический бюллетень**, 2009. Т. 18, №12. С. 28-33.
12. Способ измельчения природного цеолита для производства биологически активных добавок / Голохваст К.С., Паничев А.М., Чекрызов И.Ю., Кусайкин М.И. // **Химико-фармацевтический журнал**, 2010. Т. 44, №2. С. 54-57.
13. Голохваст К.С., Памирский И.Э., Паничев А.М. Об участии природных минералов в формировании иммунитета // **Российский аллергологический журнал**, 2010. №1, вып. 1. С. 47-48.
14. Голохваст К.С., Паничев А.М., Сергеевич А.А., Гульков А.Н., Федотова И.Г., Мишаков И.В., Ведягин А.А., Памирский И.Э. Экологические особенности взаимодействия микроорганизмов и природных минеральных факторов среды // **Известия Самарского научного центра РАН**, 2010. Т.12, №1(5). С. 1217-1220.
15. Голохваст К.С., Паничев А.М., Сергеевич А.А., Гульков А.Н., Борисов С.Ю. Эколого-токсикологическая оценка влияния минерально-кристаллического фактора среды // **Известия Самарского научного центра РАН**, 2010. Т.12, №1(5). С. 1221-1225.
16. Голохваст К.С., Памирский И.Э. Экологические и нанотоксикологические аспекты взаимодействия минералов и белков // **Вестник новых медицинских технологий**, 2010. Т. XVII, №2. С. 53-55.
17. Голохваст К.С., Паничев А.М., Памирский И.Э., Борисов С.Ю., Гульков А.Н., Рыбалка В.П. Оценка влияния цеолитита Лютогского месторождения на фагоцитарную активность нейтрофилов in vivo // **Российский аллергологический журнал**, 2010. №5, вып. 1. С. 77-78.
18. Голохваст К.С., Паничев А.М., Памирский И.Э., Борисов С.Ю., Гульков А.Н., Рыбалка В.П. Исследование влияния цеолитита Лютогского месторождения на продукцию цитокинов лейкоцитами цельной крови человека // **Российский аллергологический журнал**, 2010. №5, вып. 1. С. 79-80.
19. Голохваст К.С., Бородин Е.А., Штарберг М.А., Памирский И.Э., Паничев А.М., Мишаков И.В., Ведягин А.А., Гульков А.Н. Антиоксидантный эффект нано- и микрочастиц типичных компонентов природных воздушных взвесей in vitro // **Известия Самарского научного центра РАН**, 2010. Т.12, №1(7). С. 1732-1736.
20. Голохваст К.С. Генерики биологически активных добавок на основе цеолитов // **Биомедицина**, 2010. №4. С. 72-73.
21. Голохваст К.С., Кисилев Н.Н., Паничев А.М., Никифоров П.А., Ведягин А.А., Мишаков И.В., Памирский И.Э., Гульков А.Н. Влияние нано- и микрочастиц цеолитов на морфологические параметры почек мыши домашней Mus musculus // **Известия Самарского научного центра РАН**, 2010. Т. 12, №4(3). С. 706-709.
22. Памирский И.Э., Голохваст К.С., Паничев А.М., Штарберг М.А., Гульков А.Н., Никифоров П.А., Братская С.Ю., Бородин Е.А. Влияния нано- и микрочастиц природных минералов на агрегацию тромбоцитов человека // **Известия Самарского научного центра РАН**, 2010. - Т. 12, №4(3). - С. 725-728.
23. Чекрызов И.Ю., Паничев А.М., Сафронов П.П., Голохваст К.С., Ведягин А.А., Бухтияров В.И. Геологические и биологические аспекты находки микрочастиц природного сплава (Au-Cu-Ag) в кайнозойских цеолитизированных туфах Ванчинской впадины (Приморский край) // **Доклады Академии наук**, 2011. Т. 436, №1. С. 103-105.

Патенты РФ

24. Патент на полезную модель №76566. Голохваст К.С., Гульков А.Н., Паничев А.М., Чайка В.В., Борисов С.Ю. Установка для изучения внешних воздействий на животное. Опубликовано 27.09.2008. Бюл. №27
25. Патент РФ №2372092. Голохваст К.С., Гульков А.Н., Паничев А.М., Чекрызов И.Ю., Борисов С.Ю. Способ подготовки порошка для ингаляции. Опубликовано 10.11.2009. Бюл. №31.
26. Патент РФ №2384324. Голохваст К.С., Гульков А.Н., Паничев А.М., Борисов С.Ю. Лечебно-профилактическое средство. Опубликовано 20.03.2010. Бюл. №8
27. Патент на полезную модель РФ №100263. Голохваст К.С., Паничев А.М., Гульков А.Н. Устройство для исследования природных взвесей в воздухе. Опубликовано 10.12.2010. Бюл. №34.
28. Положительное решение о выдаче патента по заявке 2009121014 от 02.06.2009. Способ определения антиоксидантной активности вещества. Опубликовано 10.12.2010. Бюл. № 34