

ОТВЕТНАЯ РЕАКЦИЯ МИТОХОНДРИЙ ТРОМБОЦИТОВ И ЛЕЙКОЦИТОВ
ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ МИКРОЧАСТИЦ
АТМОСФЕРНОГО ВОЗДУХА

© 2019 г. Ю. К. Денисенко^{1, *}, Т. П. Новгородцева¹, Т. И. Виткина¹,
Н. В. Жукова^{2, 3}, Т. А. Гвозденко¹, В. В. Кнышова¹

¹Владивостокский филиал Дальневосточного научного центра физиологии
и патологии дыхания – Научно-исследовательский институт медицинской климатологии
и восстановительного лечения, Владивосток, Россия

²Дальневосточный федеральный университет, Школа биомедицины, Владивосток, Россия

³Национальный научный центр морской биологии Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Владивосток, Россия

*E-mail: karaman@inbox.ru

Поступила в редакцию 20.09.2018 г.

После доработки 03.12.2018 г.

Принята к публикации 03.12.2018 г.

Изучена реакция митохондрий клеток крови (тромбоцитов и лейкоцитов) здоровых жителей промышленного города-порта на воздействие микроразмерных токсикантов воздушной среды. Состояние митохондриального аппарата клеток оценивали по флуктуации качественного и количественного состава жирных кислот (ЖК) мембран митохондрий тромбоцитов и потенциалу внутренней мембраны (ПВМ) митохондрий лейкоцитов. Обследованы 62 здоровых жителя г. Владивостока (территория с высокой экологической нагрузкой, повышенным содержанием в атмосфере воздуха токсикантов микроразмерного ряда) и острова Русский (территория наиболее благоприятная по экологической обстановке и с отсутствием загрязняющих воздух микрочастиц). Спектр жирных кислот изучали методом газожидкостной хроматографии. Уровень ПВМ исследовался *ex tempore* на проточном цитофлюориметре с применением красителя JC-1. Установлено, что ответная реакция митохондрий клеток крови в условиях перманентного влияния на людей мелкодисперсных частиц атмосферного воздуха характеризуется накоплением в мембране митохондрий тромбоцитов насыщенных жирных кислот (12 : 0, 14 : 0, 16 : 0, 18 : 0) и n-6 полиненасыщенных жирных кислот (20 : 3n-6, 20 : 4n-6, 22 : 4n-6), дефицитом n-3 полиненасыщенных жирных кислот, а также снижением потенциала внутренней мембраны митохондрий лейкоцитов. Наблюдаемые изменения в архитектуре мембраны митохондрий и ее функциональной активности, свидетельствуют с одной стороны о формировании компенсаторного ответа направленного на укрепление липидного матрикса этой мембраны и уменьшение ее проницаемости, с другой – о развитии митохондриальной дисфункции, предрасположенности ядерных клеток крови (тромбоцитов и лейкоцитов) к апоптотическим изменениям. Идентификация спектра ЖК мембран митохондрий является ранним показателем нарушения функционирования клетки и универсальным высокочувствительным индикатором изменения экзо- и эндогенного гомеостаза.

Ключевые слова: митохондрия, мембрана, жирная кислота, загрязнение окружающей среды, адаптация

DOI: 10.1134/S0869813919010023

Митохондрии являются важнейшими внутриклеточными органеллами, функционально интегрированными в работу всех систем жизнеобеспечения и определяющими жизнедеятельность клеток в норме и патологии [1]. Наблюдения последних лет показали, что кроме основной функции как генератора внутриклеточной АТФ в ходе окислительного фосфорилирования, митохондрии активно вовлечены в сложную сеть регуляции жизни клетки от обмена специфическими метаболитами, образующимися исключительно в матриксе митохондрий, до освобождения апоптогенных факторов, инициирующих клеточную гибель. Митохондрии функционируют как активные сигнальные структуры и играют ключевую роль в важнейших регуляторных физиологических процессах, в том числе, в формировании приспособительных реакций организма [1–4].

Структурно-функциональная организация митохондрий обеспечивается двумя мембранами – наружной и внутренней, каркас которых составляют фосфолипиды и входящие в их состав жирные кислоты (ЖК). Основной пул ЖК преимущественно вовлечен в окислительно-восстановительные энергетические процессы и поддержание мембранного потенциала митохондрий, что способствует нормальному функционированию всей клетки в целом [1, 3]. Даже незначительное изменение состава ЖК способно менять физико-химические свойства и функциональные характеристики мембраны [2]. Модификация мембранных липидов может обуславливать как биохимическую адаптацию клетки, так и срыв процессов приспособления. Патологические изменения состава ЖК мембран митохондрий проявляются в неспособности митохондрий поддерживать электрохимический градиент ионов водорода на внутренней мембране, что выражается в снижении их мембранного потенциала [5]. Митохондриальный мембранный потенциал может изменяться под воздействием многих внутриклеточных биохимических процессов и внешних раздражителей [5–7]. Учитывая, что мембранный потенциал митохондрий является полифункциональным регулятором активности локализованных в мембране белков-ферментов, обеспечивает синтез АТФ, оценка потенциалов живой клетки является одним из наиболее адекватных методов исследования ее функционального и энергетического состояния. Поддержание мембранного потенциала служит индикатором “здоровья” митохондрий и уровня метаболической активности клеток [5].

Изучение адаптационных структурно-функциональных перестроек митохондрий под воздействием факторов окружающей среды, установление общих и специфических детерминант приспособительного ответа, является актуальной проблемой и одним из приоритетных направлений современной физиологии [8, 9].

Ведущим фактором риска для здоровья населения является загрязнение атмосферного воздуха [10–13]. В настоящее время исследования загрязнений воздушной среды перешли на качественно новый уровень в связи с возможностью выделения новых классов токсикантов – нано- и микроразмерных частиц минералов. Механизм их воздействия на живой организм принципиально отличается от крупноразмерных поллютантов и представляет наибольшую опасность для развития экологозависимой патологии [6, 12, 14, 15]. Коллективом авторов в течение длительного времени была проведена комплексная токсикологическая оценка окружающей среды разных районов города Владивостока (2010–2016 гг.), которая позволила выявить две диаметрально противоположные зоны по экологической нагрузке [11, 12, 16]. Один район – относительно благоприятная зона побережья острова Русский, другой – неблагоприятная зона – транспортная развязка материковой части г. Владивостока. В более ранних исследованиях авторами коллектива показано, что атмосферные взвеси материковой части г. Владивостока, в отличие от островной территории, насыщены опасными токсичными компонентами микроразмерного ряда (до 50 мкм, в том числе микрочастицы размером 200–300 нм) –

сажа и микрочастицы металлов (Fe, Cr, Ni, Pb, Zn) [10]. Патогенное влияние нано- и микроразмерных частиц атмосферных взвесей обусловлено их способностью преодолевать естественные барьеры организма (слизистые верхних воздушных путей), проникать внутрь клетки и оказывать провоспалительное, канцерогенное, цитотоксическое действие [6, 10, 13, 14, 17]. Одним из основных механизмов токсического действия микроразмерных частиц является их способность инициировать развитие окислительного стресса за счет гиперпродукции активных форм кислорода. Окислительный стресс приводит к прямому или косвенному повреждению ключевых клеточных компонентов, таких как липиды, белки и нуклеиновые кислоты [6, 18, 19]. Способность клетки противостоять патогенному воздействию микроразмерных ксенобиотиков во многом зависит от адекватности репаративных механизмов индивидуумов. Изучение структурно-функционального состояния митохондрий как чувствительных универсальных индикаторов изменения окружающей среды организма необходимо для понимания механизмов многих физиологических процессов и патофизиологических системных изменений в органах и тканях. Несмотря на актуальность проблемы, фундаментальные исследования влияния твердых микрочастиц атмосферного воздуха на митохондрии ядерных клеток крови в современной литературе слабо освещены.

В связи с этим целью работы стало: изучить ответную реакцию митохондрий тромбоцитов и лейкоцитов на токсиканты воздушной среды микроразмерного ряда по составу жирных кислот их мембран и мембранному потенциалу у здоровых жителей промышленного города-порта.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании приняли участие 62 здоровых жителя г. Владивостока и о. Русский, проживающих и работающих не менее 5 лет в радиусе 1 км от исследуемых территорий. Контингент обследуемых составил 28 мужчин и 34 женщины в возрасте от 28 до 54 лет (средний возраст 37 ± 6 лет), полностью информированных о целях, задачах и процедурах исследования, давших письменное информированное согласие и прошедших предварительное клинико-лабораторное обследование и отбор. Критериями исключения служили беременность, наличие в медицинской карте записи о хроническом заболевании или указании на него, сделанного в устной форме, наличие острого заболевания, прием на момент испытания лекарственных препаратов. Исследование было одобрено Комитетом по биомедицинской этике Владивостокского филиала ДНЦ ФПД – Научно-исследовательского института медицинской климатологии и восстановительного лечения (Владивостокский филиал ДНЦ ФПД НИИ МКВЛ).

Добровольцы были разделены на две группы, сопоставимые по возрасту и полу, в зависимости от места проживания: группа 1 (30 человек) – относительно-благоприятная зона – остров Русский, являющийся административным районом г. Владивостока; группа 2 (32 человека) – неблагоприятная зона – материковая зона промышленного города-порта Владивосток.

Для газожидкостного анализа ЖК мембран митохондрий тромбоцитов первоначально выделяли тромбоциты путем центрифугирования крови в течение 30 мин при 1000 об./мин (центрифуга СМ-6М, Латвия) [20]. Обогащенную тромбоцитами фракцию плазмы отбирали в отдельную пробирку и центрифугировали еще 30 мин при 3000 об./мин. Митохондрии из тромбоцитов выделяли стандартным методом дифференциального центрифугирования в сахарозной среде [21]. Сахарозная среда выделения готовилась из 0.75 М сахарозы, 5×10^{-5} М этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), 0.5%-ного бычьего сывороточного альбумина, 0.01 М фосфатного буфера. Чистый супернатант с мембранами митохондрий получали в результате

5-ти кратного центрифугирования при 14 000 об./мин (центрифуга с охлаждением Z383K, Hermle LaborTechnik, Германия). До момента анализа образцы хранились при температуре -80°C . Липиды экстрагировали из мембран митохондрий тромбоцитов, используя смесь хлороформ : метанол (1 : 2 об./об.) [22]. Метилвые эфиры ЖК получали с помощью последовательной обработки липидов согласно методу [23], а затем очищали препаративной тонкослойной хроматографией в бензоле. Метилвые эфиры ЖК элюировали хлороформом, растворитель упаривали, используя вакуумный роторный испаритель (IKA RV 05, Германия). Метилвые эфиры ЖК растворяли в 0.2 мл гексана и анализировали на хроматографе Shimadzu GC-2010 (Япония), снабженном пламенно-ионизационным детектором, с использованием кварцевой капиллярной колонки (0.25 мм \times 30 м, Supelcowax 10; Supelco, США). Температура колонки составляла 205°C , температура детектора и инжектора 250°C , в качестве газа-носителя использовали гелий. Метилвые эфиры ЖК идентифицировали, сравнивая с аутентичными стандартами (Supelco, США) и используя таблицу величин эквивалентных длинам цепей [24]. Данные представляли в процентах от суммарного содержания ЖК (процентное содержание).

Потенциал внутренней мембраны митохондрий исследовали в лейкоцитах периферической крови, выделенных на градиенте фикола-верографина [25]. Раствор фикола-верографина с удельной плотностью 1.077 г/мл готовили на стерильной дистиллированной воде, смешивая 24 части 9%-ного раствора фикола и 10 частей 34%-ного раствора верографина. Чистую фракцию лейкоцитов получали путем двукратного центрифугирования при 4°C при 600 g (центрифуга с охлаждением Z383K, Hermle LaborTechnik, Германия) сначала в течение 30, а затем 10 мин. Лейкоцит является универсальной моделью клетки для изучения прижизненных внутриклеточных процессов. ПВМ митохондрий лейкоцитов исследовали *ex tempore* на проточном цитофлюориметре *BD FACS Canto IITM* с применением красителя JC-1 согласно протоколу (набор MitoProb JC-1 Assay Kit for flow cytometry, Life Technologies, США). Мембранный потенциал внутренней мембраны митохондрий лейкоцитов из крови человека оценивался в процентном количестве клеток со сниженным ПВМ.

Математический анализ полученных данных осуществляли с помощью программы "Statistica", версия 6.1 (серия 1203С для Windows). Проверка нормальности распределения количественных признаков выполнялась с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Статистическую значимость различий средних величин определяли по t-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Качественный состав ЖК мембран митохондрий тромбоцитов крови здоровых жителей г. Владивостока представлен компонентами с длиной углеродной цепи от C10 до C24, как четных, так и нечетных, с прямой цепью и разветвленных, насыщенных, мононенасыщенных и полиненасыщенных (табл. 1). В таблицу не внесены отдельные представители жирных кислот, содержание которых не превышает 0.1%. В основном это насыщенные ЖК (10 : 0, 19 : 0, 20 : 0, 22 : 0), некоторые моноеновые (14 : 1, 18 : 1n-5, 20 : 1, 22 : 1), диеновые (18 : 2Δ5.9), триеновые (20 : 3n-3), разветвленные кислоты изо- и антеизостроения.

Особенностью количественного состава ЖК здоровых жителей, проживающих в неблагоприятном районе промышленного города-порта (группа 2) стало накопление насыщенных жирных кислот (НЖК) на фоне уменьшения доли некоторых моноеновых (МНЖ), полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в сравнении с проживающими на территории острова Русский (группа 1). Так, в группе 2 обнаружено увеличение лауриновой (12 : 0; $p < 0.05$), миристиновой (14 : 0; $p < 0.001$),

Таблица 1. Состав жирных кислот мембран митохондрий тромбоцитов здоровых жителей г. Владивостока

ЖК, %	Группа 1 (жители о. Русский), <i>n</i> = 30	Группа 2 (жители промышленной части г. Владивостока), <i>n</i> = 32
Насыщенные жирные кислоты (НЖК)		
12 : 0	0.50 ± 0.04	0.65 ± 0.01*
14 : 0	1.79 ± 0.32	2.88 ± 0.19***
16 : 0	25.39 ± 0.56	29.64 ± 0.84***
17 : 0	0.66 ± 0.03	0.75 ± 0.03*
18 : 0	15.59 ± 0.59	18.21 ± 0.23***
20 : 0	0.78 ± 0.05	0.90 ± 0.14*
Сумма НЖК	44.71 ± 1.82	53.03 ± 1.22***
Моноеновые жирные кислоты (МЖК)		
16 : 1n-9	1.95 ± 0.15	1.75 ± 0.06*
16 : 1n-7	1.65 ± 0.12	1.71 ± 0.12
18 : 1n-9	18.84 ± 0.42	14.41 ± 0.50***
18 : 1n-7	1.85 ± 0.11	1.98 ± 0.06
Сумма МЖК	24.29 ± 2.10	19.85 ± 1.49**
Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) n-6		
18 : 2n-6	12.34 ± 0.87	8.12 ± 0.42***
20 : 3n-6	0.29 ± 0.02	0.64 ± 0.04***
20 : 4n-6	4.47 ± 0.29	6.90 ± 0.74***
22 : 4n-6	0.36 ± 0.04	0.78 ± 0.10***
22 : 5n-6	0.21 ± 0.02	0.12 ± 0.01***
Сумма ПНЖК n-6	17.67 ± 2.76	16.58 ± 1.42
Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) n-3		
18 : 3n-3	0.52 ± 0.07	0.43 ± 0.04*
20 : 5n-3	0.87 ± 0.09	0.76 ± 0.05*
22 : 5n-3	0.56 ± 0.06	0.61 ± 0.05
22 : 6n-3	1.30 ± 0.17	1.41 ± 0.08
Сумма ПНЖК n-3	3.25 ± 0.38	3.21 ± 0.32

Примечание. (*) – статистическая значимость различий относительно группы 1: * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$.

пальмитиновой (16 : 0; $p < 0.001$), стеариновой (18 : 0; $p < 0.001$) кислот. Выявленные изменения в содержании НЖК в мембране митохондрий отразились в увеличении их суммы ($p < 0.001$).

Среди моноеновых ЖК у лиц группы 2 отмечалось падение доли ЖК семейства n-9 – пальмитоолеиновой (16 : 1n-9; $p < 0.05$), олеиновой (18 : 1n-9; $p < 0.001$), по сравнению с показателями здоровых лиц, проживающих в относительно благоприятной зоне. Различий в уровне 16 : 1n-7 и 18 : 1n-7 в мембране митохондрий клеток крови здоровых жителей выявлено не было. Суммарное содержание МЖК в группе 2 было сниженным по сравнению с группой 1 ($p < 0.01$).

В исследуемых группах в мембране митохондрий установлены флуктуации среды основных полиненасыщенных жирных кислот как n-6, так и n-3 семейств.

Таблица 2. Потенциал внутренней мембраны митохондрий лейкоцитов здоровых людей г. Владивостока

Группа/Параметры	Показатель ПВМ, %
Группа 1(жители о. Русский), $n = 30$	0.67 ± 0.03
Группа 2 (жители промышленной части г. Владивостока), $n = 32$	$1.03 \pm 0.05^*$

Примечание. * – статистическая значимость различий между группами при $p \leq 0.05$.

В частности, в митохондриальной мембране пациентов группы 2 выявлены низкие значения для следующих кислот: линолевой ($18 : 2n-6; p < 0.001$), α -линоленовой ($18 : 3n-3; p < 0.05$), эйкозапентаеновой ($20 : 5n-3; p < 0.001$), докозапентаеновой семейства $n-6$ ($22 : 5n-6; p < 0.001$). Интересная динамика прослеживалась в относительном содержании длинноцепочечных ПНЖК семейства $n-6$ у здоровых лиц, проживающих в неблагоприятном районе промышленного города-порта. Под влиянием микрочастиц атмосферного воздуха в мембране митохондрий происходило повышение пула дигомо- γ -линоленовой ($20 : 3n-6; p < 0.001$), арахидоновой ($20 : 4n-6; p < 0.001$), докозатетраеновой ($22 : 4n-6; p < 0.001$) кислот. Суммарные значения процентного содержания $n-3$ и $n-6$ ПНЖК в мембране митохондрий у пациентов группы 2 не отличались от таковых показателей людей группы 1.

Обобщая изменения, выявленные в содержании ЖК, можно отметить, что ответная реакция мембраны митохондрий на воздействие токсикантов микроразмерного ряда окружающей среды характеризовалась развитием дефицита эссенциальных и физиологически важных ПНЖК ($18 : 2n-6, 18 : 3n-3, 20 : 5n-3$) на фоне накопления большинства насыщенных жирных кислот ($12 : 0, 14 : 0, 16 : 0, 18 : 0$) и $n-6$ ПНЖК ($20 : 3n-6, 20 : 4n-6, 22 : 4n-6$).

Оценка содержания лейкоцитов со сниженным мембранным потенциалом митохондрий в исследуемых группах выявила значительное повышение данного показателя у лиц, проживающих в неблагоприятном районе промышленного города-порта (табл. 2). В группе 1 доля клеток со сниженным ПВМ составила 0.67% ($p < 0.001$), тогда как у лиц группы 2 ПВМ вырос на 53% и составил 1.03%. Определение ПВМ является одним из наиболее адекватных методов прижизненного исследования функционального состояния митохондрий клетки, указывающий на оптимальное протекание окислительно-восстановительных процессов, а также критерием оттока [5]. Полученные результаты указывают на угнетение клеточной дыхательной активности, развитие гипоксии и активацию апоптотических процессов под воздействием мелкодисперсных частиц атмосферного воздуха.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Многочисленные экспериментальные исследования, проведенные во Владивостокском филиале ДНЦ ФПД НИИ МКВЛ и другими авторами указывают на то, что митохондрии являются не только первичными мишенями патологических воздействий, но и универсальными высокочувствительными вникрилеточными индикаторами изменения экзо- и эндогенного гомеостаза [2–5, 11, 26]. Способность митохондриального аппарата клеток подстраиваться под изменение окружающей среды свидетельствует о его пластичности и определяет адаптационную способность организма. Загрязнение атмосферного воздуха является одним из наиболее опасных факторов экологического риска для здоровья населения [11, 13, 27].

Ответная реакция митохондриального аппарата ядерных клеток крови человека в условии перманентного влияния мелкодисперсных частиц атмосферного воздуха характеризовалась накоплением в мембране митохондрий тромбоцитов насыщен-

ных ЖК (12 : 0, 14 : 0, 16 : 0, 18 : 0) и n-6 ПНЖК (20 : 3n-6, 20 : 4n-6, 22 : 4n-6) при недостатке n-3 ПНЖК, снижением потенциала внутренней мембраны митохондрий лейкоцитов. Известно, что при адаптации к неблагоприятным факторам среды клетка для укрепления липидного матрикса цитомембраны и уменьшения ее проницаемости действует особые адаптационные механизмы, заключающиеся в увеличении доли насыщенных жирных кислот, перераспределении между кислотами n-6 и n-3 семейств, в сторону накопления 20 : 4n-6, 22 : 4n-6 [28]. Выявленные похожие флуктуации в составе жирных кислот мембраны митохондрий указывают на одинаправленные изменения архитектуры клеточной и субклеточной мембраны в неблагоприятных условиях окружающей среды.

В то же время, учитывая специфику выполняемых митохондриями функций (окислительное фосфорилирование, производство АТФ, поддержание ионного гомеостаза), высокая плотность субклеточной мембраны за счет накопления НЖК и ПНЖК n-6 способствует нарушению трансмембранного переноса ионов Ca^{2+} , активации образования активных форм кислорода, повреждению мембранной структуры, выходу апоптотических факторов [1]. Установленное увеличение количества лейкоцитов со сниженным ПВМ у лиц, проживающих в условиях экологического напряжения, свидетельствует об уменьшении энергообеспечения клетки, гипоксии, генерации активных форм кислорода, активации апоптотических механизмов. По-видимому, повышенное содержание в воздухе микроразмерных частиц приводит к тому, что митохондриальный аппарат клетки находится в постоянном напряжении, что в конечном итоге приводит к срыву компенсаторных процессов и развитию болезней декомпенсации – хроническим системным заболеваниями. То есть, стрессорные изменения мембранных структур определяют как устойчивость организма к действию неблагоприятных факторов и формированию компенсаторных процессов, так и способствуют срыву адаптации и развитию патологических процессов.

Итак, отрицательное воздействие мелкодисперсных частиц на здоровье людей подтверждается результатами исследования митохондриального аппарата клеток крови. Наблюдаемые изменения в архитектуре митохондриальной мембраны и ее функциональной активности свидетельствуют о развитии митохондриальной дисфункции в ответ на воздействие микрочастиц воздуха. На этом этапе повреждения в наибольшей степени затрагивают самые чувствительные параметры организма – морфо-функциональное состояние субклеточных структур и степень предрасположенности клеток к апоптотическим изменениям. Таким образом, идентификация спектра ЖК мембран митохондрий является ранним индикаторным критерием нарушения функционирования клетки. Изучение механизмов изменения гомеостаза под влиянием факторов окружающей среды, молекулярно-биохимических клеточных дефектов позволит расширить область знаний о развитии экологически обусловленной патологии.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование жирных кислот было поддержано Российским научным фондом, грант № 14-50-00034 для Н.В. Жуковой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Титов В.Н.* Функция митохондрий, карнитин, коэнзим-А, жирные кислоты, глюкоза, цикл Рендла и инсулин (лекция). Клин. лаб. диагностика. 2: 32–42. 2012. [Tinov V.N. The function of mitochondrion, carnitin, fatty acids, glucose, the Rendle cycle and insulin: a lecture. Clin. Lab. Diagnostika 2. 32–42. 2012. (In Russ.)].

2. Денисенко Ю.К., Виткина Т.И., Новгородцева Т.П., Кондратьева Е.В., Жукова Н.В., Борщев П.В. Спектр жирных кислот мембран митохондрий тромбоцитов больных хроническим необструктивным бронхитом. Бюл. физиол. и патол. дыхания. 50: 34–38. 2013. [Denisenko Y. K., Vitkina T.I., Novgorodtseva T.P., Kondratieva E.V., Zhukova N.V., Borshchev P.V. Fatty acid spectrum of mitochondrial thrombocytes membranes in patients with chronic non-obstructive bronchitis. Bul. fiziol. and pathol. breathing. 50: 34–38. 2013. (In Russ.)].
3. Денисенко Ю.К., Новгородцева Т.П., Кондратьева Е.В., Жукова Н.В., Антонюк М.В., Кнышова В.В., Минева Е.Е. Морфофункциональное состояние митохондрий клеток крови при бронхиальной астме. Клиническая медицина. 10: 47–52. 2015. [Denisenko Y.K., Novgorodtseva T.P., Kondrateva E.V., Zhukova N.V., Antonyuk M.V., Knyshova V.V., Mineeva E.E. Morpho-functional characteristics of blood cell mitochondria in bronchial asthma. Clin. Med. 10: 47–52. 2015. (In Russ.)].
4. Денисенко Ю.К., Новгородцева Т.П., Жукова Н.В., Виткина Т.И., Антонюк М.В. К вопросу о митохондриальной дисфункции при хронической обструктивной болезни легких. Бюл. физиол. и патол. дыхания. 60: 28–33. 2016. [Denisenko Y.K., Novgorodtseva T.P., Zhukova N.V., Vitkina T.I., Antonyuk M.V. Mitochondrial dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. Bul. fiziol. pathol. breathing. 60: 28–33. 2016. doi 10.12737/20048 (In Russ.)]. doi. 10.12737/20048
5. Лобанова Е.Г., Кондратьева Е.В., Минева Е.Е., Караман (Денисенко) Ю.К. Мембранный потенциал митохондрий тромбоцитов у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких. Клин. лаб. диагностика. 6: 13–16. 2014. [Lobanova E.G., Kondratieva E.V., Mineyeva E.E., Karaman (Denisenko) Yu.K. The membrane potential of mitochondria of thrombocytes in patients with chronic obstructive disease of lungs. Clin. Lab. Diagnostika. 6: 13–16. 2014. (In Russ.)].
6. Jomova K., Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. Toxicology. 283: 65–87. 2011. doi 10.1016/j.tox.2011.03.001
7. Zorova L.D., Popkov V.A., Plotnikov E.Y., Silachev D.N., Pevzner I.B., Jankauskas S.S., Babenko V.A., Zorov S.D., Balakireva A.V., Juhaszova M., Sollott S.J., Zorov D.B. Mitochondrial membrane potential. Anal. Biochemi. 552: 50–59. 2018. doi: [https://doi.org/doi 10.1016/j.ab.2017.07.009](https://doi.org/doi%2010.1016/j.ab.2017.07.009)
8. Weinhouse C. Mitochondrial-epigenetic crosstalk in environmental toxicology. Toxicology. 391(1): 5–17. 2017. doi. org/ doi 10.1016/j.tox.2017.08.008
9. Meyer J.N., Leuthner T.C., Luz A.L. Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity. Toxicology. 391: 42–53. 2017. doi. org/ doi 10.1016/j.tox.2017.07.019
10. Péter S., Holguin F., Wood L.G., Clougherty J.E., Raederstorff D., Antal M., Weber P., Eggersdorfer M. Nutritional solutions to reduce risks of negative health impacts of air pollution. Nutrients. 7(12): 10398–10416. 2015. doi 10.3390/nu7125539
11. Golokhvast K., Vitkina T., Gvozdenko T., Kolosov V., Yankova V., Kondratieva E., Gorkavaya A., Nazarenko A., Chaika V., Romanova T., Karabtsov A., Perelman J., Kiku P., Tsatsakis A. Impact of atmospheric microparticles on the development of oxidative stress in healthy city/industrial seaport residents. Oxid. Med. Cell. Longevity. 91: 10 p. 2015. doi 10.1155/2015/412173
12. Veremchuk L.V., Yankova V.I., Vitkina T.I., Golokhvast K.S. Urban air pollution, climate and its impact on asthma morbidity. Asian Pacific J. Trop. Biomed. 6(1): 76–79. 2016. doi. [https://doi.org/doi 10.1016/j.apjtb.2015.10.001](https://doi.org/doi%2010.1016/j.apjtb.2015.10.001)
13. Adams R., Al-Bulushi H., Berube K., Jones T. Intratracheal instillation of air pollution particles in rats is associated with prolonged systemic inflammation, increased leukocyte intracellular F-actin and damage to the vascular endothelium. Biorheology. 49: 14–206. 2012.
14. Meng X., Zhang Y., Kun-Qi Y., Yang Y.K., Zhou X.L. Potential Harmful Effects of PM2.5 on Occurrence and Progression of Acute Coronary Syndrome: Epidemiology, Mechanisms, and Prevention Measures. Int. J. Environ. Res. Public. Health. 13(8): 748. 2016. doi 10.3390/ijerph13080748
15. Ulintz L., Sun Q. Ambient particulate matter pollution on lipid peroxidation in cardiovascular diseases. Environment. Dis. 1(4): 109–117. 2016. doi 10.4103/2468-5690.198616
16. Veremchuk L.V., Tsarouhas K., Vitkina T.I., Mineeva E.E., Gvozdenko T.A., Antonyuk M.V., Rakitskii V.N., Sidletskaya K.A., Tsatsakis A.M., Golokhvast K.S. Impact evaluation of environmental factors on respiratory function of asthma patients living in urban territory. Environment. Pollution. 235: 489–496. 2018. doi 10.1016/j.envpol.2017.12.122
17. Li R., Kou X., Geng H., Xie J., Tian J., Cai Z., Dong C. Mitochondrial damage: an important mechanism of ambient PM2.5 exposure-induced acute heart injury in rats. J. Hazard.Mater. 287: 392–401. 2015. doi 10.1186/s12940-016-0095-2
18. Grevendonk L., Janssen B.G., Vanpoucke C., Lefebvre W., Hoxha M., Bollati V., Nawrot T.S. Mitochondrial oxidative DNA damage and exposure to particulate air pollution in mother-newborn pairs. Environ Health. 15: 10. 2016. doi10.1016/j.jhazmat.2015.02.006

19. Янькова В.И., Веремчук Л.В., Виткина Т.И., Гвозденко Т.А., Голохваст К.С. Ответная реакция системы “перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита” на комплексное воздействие природно-экологических факторов при заболеваниях органов дыхания. Сибирск. научн. мед. журн. 36(3): 94–102. 2016. [Yan'kova V.I., Veremchuk L.V., Vitkina T.I., Gvozdenko T.A., Golokhvast K.S. The response of the lipid peroxidation - antioxidant protection system on the complex impact of the environmental factors in respiratory diseases. Siberian Sci. Med. J. 36(3): 94–102. 2016. (In Russ.)].
20. Клестова В.И., Шабанова Л.И., Рябов Н.В., Ипатов С.Г. Получение чистой фракции тромбоцитов из периферической крови доноров. Гравитационная хирургия крови. Под ред. Гаврилова О.К. М: Медицина. 1983. С. 154–155. [Klestova V.I., Shabanova L.I., Ryabov N.V., Ipatov S.G. Obtaining a pure platelet fraction from peripheral blood donors. Gravitational blood surgery. Ed. O.K. Gavrilova. M. Medicine. 154–155. 1983 (In Russ.)].
21. Davis J.T. A technique for the isolation of mitochondria from bovine lymphocytes. Method in enzymology. 10. 114–117. 1967.
22. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol. 37: 911–917. 1959. <https://doi.org/doi.10.1139/o59-099>.
23. Carreau J.P., Duback J.P. Adaptation of a macroscale method to the microscale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extract. J. Chromatogr. 151(3): 384–390. 1978. doi 10.1016/S0021-9673(00)88356-9
24. Christie W.W. Equivalent chain-lengths of methyl ester derivatives of fatty acids on gas-chromatography – a reappraisal. J. Chromatogr. 447(2): 305–314. 1978. doi 10.1016/0021-9673(88)90040-4
25. Вуит А. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Scand. J. Clin. Lab. Investig. 21(97): 1–9. 1968.
26. Денисенко Ю.К., Новгородцева Т.П., Виткина Т.И., Антонюк М.В., Бочарова Н.В. Состав жирных кислот мембран митохондрий тромбоцитов при хронических заболеваниях органов дыхания. Клин. мед. 96(4): 343–347. 2018. [Denisenko Yu.K., Novgorodtseva T.P., Vitkina T.I., Antonyuk M.V., Bocharova N.V. The fatty acid composition of the mitochondrial membranes of platelets in chronic obstructive pulmonary disease. Clin. medicine. 96 (4): 343–347. 2018. doi. 10.18821/0023-2149-2018-96-4-343-347 (In Russ.)].
27. Барскова Л.С., Веремчук Л.В., Виткина Т.И., Голохваст К.С., Янькова В.И. Формирование загрязнения атмосферного воздуха города Владивостока и его влияние на распространение болезней органов дыхания. Сибирский научный медицинский журнал. 35(4): 55–61. 2015. [Barskova L.S., Veremchuk L.V., Vitkina T.I., Golokhvast K.S., Yankova V.I. The development of air pollution in city and its impact on respiratory morbidity. Siberian Sci. Med. J. 35(4): 55–61. 2015. (In Russ.)].
28. Караман (Денисенко) Ю.К., Новгородцева Т.П., Жукова Н.В., Янькова В.И. Состав фосфолипидов и активность редокс-системы глутатиона печени крыс в условиях пролонгированной высокожировой нагрузки. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 98(8): 1000–1007. 2012. [Karaman (Denisenko) Y. K., Novgorodtseva T.P., Zhukova N.V., Yankova V.I. Liver phospholipids composition and activity of glutathione redox-system in rats on prolonged high-fat diet. Russ. J. Physiol. 98(8): 1000–1007. 2012. (In Russ.)].

The Response of Platelet and Leukocyte Mitochondria of Healthy Residents on the Impact of Atmospheric Microparticles

Yu. K. Denisenko^{a, *}, T. P. Novgorodtseva^a, T. I. Vitkina^a, N. V. Zhukova^{b, c},
T. A. Gvozdenko^a, V. V. Knysheva^a

^aVladivostok Branch of Federal State Budgetary Science Institution "Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration" Institute of Medical Climatology and Rehabilitation, Vladivostok, Russia

^bFar Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

^cNational Scientific Center of Marine Biology, Far East Branch, Russian Academy of Science, Vladivostok, Russia

*e-mail: karaman@inbox.ru

Abstract—The influence of atmospheric microparticles on the state of human platelet and leukocyte mitochondria in healthy residents of the city of Vladivostok was studied. The state of mitochondria was assessed by changing the composition of membrane fatty acids and the inner mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_{\text{mito}}$). The observation

groups included 62 residents of Vladivostok and the Russian Islands at the age of 28 to 54 years. Vladivostok is taken as a territory with a high content of toxicants in the air of the micrometer range, island Russky - as the territory is most favorable for the environmental situation and the absence of air polluting microparticles. The fatty acid spectrum was studied by gas-liquid chromatography. The level of $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ was studied *ex tempore* on flow cytofluorimeter. It was found that influence of atmospheric microparticles the accumulation of saturated fatty acids (12 : 0, 14 : 0, 16 : 0, 18 : 0) and n-6 polyunsaturated fatty acids (20 : 3n-6, 20 : 4n-6, 22 : 4n-6), a decrease in n-3 polyunsaturated fatty acids and $\Delta\Psi_{\text{mito}}$. The observed changes in the architecture of the inner mitochondrial membrane and its functional activity testify, on the one size, of the formation of compensatory reactions aimed at strengthening the lipid matrix of the membrane and reducing its permeability, on the other - on the development of mitochondrial dysfunction, the predisposition of cells to apoptotic changes. Identification of the spectrum of mitochondrial fatty acids membranes is an early indication of the disruption of cell functioning.

Keywords: mitochondria, membrane, fatty acid, environmental pollution, adaptation