

На правах рукописи

Дьякова Елена Юрьевна

**ЛОКАЛЬНАЯ И ДИСТАНТНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ
АКТИВНОСТИ ГЛАДКИХ МЫШЦ ВОЗДУХОНОСНЫХ ПУТЕЙ**

**03.03.01 – физиология
14.03.03 – патологическая физиология**

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

Томск – 2011

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор

Капилевич Л.В.

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Барбараш Н.А.

доктор медицинских наук, профессор,

член-корреспондент РАМН

Киселев В.И.

доктор медицинских наук

Наследникова И.О.

Ведущая организация:

ГУ НИИ физиологии СО РАМН, г. Новосибирск

Защита состоится: « 28 » октября 2011 г. в 10.00 на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050 г. Томск, Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета

Автореферат разослан « » _____ 201_ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Петрова И.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

В настоящее время не теряют своей актуальности исследования, направленные на выяснение внутриклеточных механизмов регуляции функций гладких мышц, входящих в состав практически всех полых органов. Детальное изучение этого вопроса лежит в основе формирования целостного представления о функционировании гладких мышц и, следовательно, двигательной функции внутренних органов.

В разное время при открытии очередного звена цепи механизмов регуляции функционирования клетки следовало большое количество работ, сосредоточенных на раскрытии роли данного фактора в реализации конкретного пути. В первой половине 70-х годов прошлого столетия большое внимание было уделено изучению циклического аденозинмонофосфата [В.Ю. Васильев, Н.Н. Гуляев, Е.С. Северин, 1975; K. Unsicker, J.H. Chamley, 1976; Y. Hashimoto, H. Sasaki, K. Iwatsuki, 1976], во второй половине 70-х годов, начале 80-х активно изучалась кальцийзависимая сигнальная система [В.Д. Романенко, 1975; R. Casteels, C. Van Breemen, 1975; K.R. Hightower, V.N. Reddy, 1981; J.L. Ram, U.A. Shukla, R. Parti, R.L. Goines, 1984]. На 90-е, 2000-е годы пришлось исследование роли сигнальной молекулы оксида азота и связанного с ним цГМФ-зависимого сигнального пути [S. Moncada et al., 1987; 1989; 1990; 1992; R.E. Catalán, A.M. Martínez, L. Gargiulo, A. Liras, 1995; N. Maulik, D.T. Engelman, M. Watanabe, 1995; K. Witte, B. Lemmer, 1996; O.Z. Chi, X. Liu, H.R. Weiss, 1999; H. Yawo, 1999; L. Bosgraaf, P.J. Van Haastert, 2002; A.A. Steiner, L.G. Branco, 2003].

Одним из современных направлений является изучение участия молекул газов (NO, CO, H₂S) в регуляции внутриклеточных процессов [М.Б. Баскаков, 2010; G. Yang, L. Wu, B. Jiang et al., 2008; A. Li, Q. Xi, E.S. Umstot et al., 2008]. Интересы исследователей также распространяются на изучение влияния цитокинов на работу сигнальных путей [M.E. Martino, J.C. Olsen, N.B. Fulcher et al., 2009; E. Gkoumassi, B.G. Dekkers, M.J. Dröge et al., 2007], реализующими свои эффекты через цитоскелет [Б. Албертс и др., 1994].

Постоянное внимание исследователей к данным проблемам обусловлено тем, что именно на субклеточном уровне берут начало все патологические процессы, проявляющиеся на организменном уровне в виде симптомов и синдромов различных заболеваний. Фундаментальные исследования, направленные на вскрытие механизмов функционирования клетки в физиологических условиях и изучение их изменений при различных нефизиологических состояниях, позволяют находить точки приложения корректного патогенетически обусловленного терапевтического воздействия. Особое значение подобное направление научных изысканий имеет для системы дыхания. Значительная часть заболеваний респираторной системы связана с нарушением регуляторных механизмов гладкомышечных клеток стенки воздухоносных путей [В.Н. Абросимов, 1990, Y. Sato, T. Kishi, T. Umemura, 1998, А.Г. Чучалин, 2008].

Благодаря существенному прогрессу в исследовании данной проблемы на сегодняшний момент накоплено огромное количество результатов, однако единого мнения о механизмах локальной и дистантной регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток не сформировано. В представлении о регуляции гладких мышц воздухоносных путей сохраняются некоторые противоречия и пробелы.

Например, в одних работах говорится, что лейкотриены вызывают сокращение гладкой мускулатуры, простагландины потенцируют ее расслабление [P.E. Moore, T. Lahiri, J.D. Laporte et al., 2001; R.S. Lan, D.A. Knight, G.A. Stewart, 2001], в других – что и простагландины и лейкотриены вызывают сокращение гладких мышц [D. Schaafsma, R. Gosens, I.S. Bos et al., 2005; V. Schlemper, R. Medeiros, J. Ferreira et al., 2005]. Также широко известен сократительный эффект гистамина на гладкие мышцы, реализующийся через рецептор-управляемый вход Ca^{2+} в гладкомышечные клетки, освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо и активацию фосфолипазы C. Однако наряду с этим существуют отдельные данные о том, что гистамин опосредует расслабление гладкомышечных клеток воздухоносных путей морских свинок. Среди возможных механизмов расслабления называют ингибирование холинергической нейротрансмиссии. Не исключается также роль эпителия в этом процессе [M. Ichinose, C.D. Stretton, J.C. Schwartz et al., 1989].

Остаются невыясненными вопросы о влиянии эпителия на сократительную активность гладких мышц бронхиального дерева при формировании состояния гиперреактивности и участии цитоскелета в реализации сократительной функции гладких мышц бронхов.

Остается открытым вопрос о значении оксида азота в регуляции сократительной активности гладких мышц при бронхиальной астме, так как он считается главным претендентом на роль расслабляющего фактора. При этом уровень его метаболитов в конденсате выдыхаемого воздуха больных бронхиальной астмой значительно возрастает в период обострения параллельно тяжести приступа [B.A. Невзорова и др. 2003; G. Rolla, A. Malinovsky, I. Badiu et al., 2011].

В последнее время, кроме известных путей регуляции сократительной активности гладких мышц, все больше внимания уделяется ранее неисследованным соединениям экзогенного происхождения, влияющим на состояние дыхательной системы, изучение влияния которых на живые объекты еще только начинается. К таким веществам относятся получившие в настоящее время широкое распространение в производственной сфере наноструктурные материалы. Изучение их влияния на организм не только имеет серьезную теоретическую ценность, но и важный прикладной аспект, так как глубокое исследование подобного воздействия может создать технологии контроля оценки токсического повреждения организма наноматериалами.

Все изложенное обуславливает выбор цели и задач настоящего исследования.

Цель исследования:

Изучить роль локальных и дистантных звеньев в регуляции гладких мышц воздухоносных путей при формировании гиперреактивности.

Задачи исследования:

1. Исследовать влияние эпителия на сократительную активность гладких мышц воздухоносных путей в физиологических условиях и в условиях формирования гиперреактивности.

2. Изучить влияние нитросоединений на регуляцию сократительной активности воздухоносных путей в физиологических условиях и в условиях формирования гиперреактивности.

3. Исследовать влияние ингибиторов ферментов метаболизма арахидоновой кислоты на сократительную активность воздухоносных путей в физиологических условиях и в условиях формирования гиперреактивности.

4. Определить роль интерлейкина 5 и интерлейкина 4 в регуляции тонуса воздухоносных путей в физиологических условиях и в условиях формирования гиперреактивности.

5. Выяснить роль компонентов цитоскелета в реализации локальных механизмов регуляции гладких мышц воздухоносных путей морских свинок в физиологических условиях и при формировании гиперреактивности.

6. Исследовать влияние аэрозолей нанодисперсных структур CoFe_2O_4 на сократительные реакции гладких мышц воздухоносных путей морских свинок.

Положения, выносимые на защиту:

1. Эпителий воздухоносных путей модулирует сократительные реакции гладких мышц, характер этого воздействия зависит как от факторов, запускающих сократительные ответы, так и от исходного состояния гладкомышечных клеток. В условиях формирования гиперреактивности модулирующее влияние эпителия на сократительную активность гладких мышц утрачивается. Этот эффект связан с изменением чувствительности гладкомышечных клеток к релаксирующим факторам (нитроксидазгические реакции гладких мышц от сенсibilизированных животных зависят от вида NO-донора: снижаются при действии нитрозоглутатиона и увеличиваются при действии нитропруссиды натрия).

2. Метаболиты арахидоновой кислоты, а так же интерлейкины 4 и 5 в физиологических условиях потенцируют сократительные реакции гладкомышечных клеток и угнетают их ответы на дилатационные воздействия. Эти эффекты сохраняются, а в ряде случаев даже усиливаются в условиях формирования гиперреактивности. Рекомбинантный рецептор интерлейкина 5 устраняет эффект экзогенного интерлейкина 5.

3. Величина гиперкалиевого сокращения гладких мышц зависит от характера дезинтеграции элементов цитоскелета: разрушение микротрубочек потенцирует сократительные ответы, а разрушение микрофиламентов –

угнетает. В условиях формирования гиперреактивности эффект дезинтеграции цитоскелета на сократительные рецептор-зависимые реакции гладкомышечных сегментов снижается.

4. Влияние нанодисперсных структур на сократительные реакции гладких мышц воздухоносных путей как при ингаляционном введении, так и при воздействии на изолированные сегменты сходно с эффектом дезинтегратора всех компонентов цитоскелета колхицина – модулирующее влияние определяется предсокращающим фактором и исходным состоянием гладкомышечных клеток.

Научная новизна

Впервые установлено, что в случае предсокращения сегментов воздухоносных путей гистамином адренергические дилатационные реакции в присутствии эпителия усиливаются, в случае предсокращения гиперкалиевым раствором – ослабляются.

Показано, что при сенсibilизации эпителий теряет способность модулировать сократительные реакции подлежащих гладких мышц воздухоносных путей.

Выявлено, что нитроксидергические дилатационные реакции гладких мышц воздухоносных путей при сенсibilизации зависят от вида NO-донора: уменьшаются реакции, вызванные нитрозоглутатионом, и усиливаются реакции при воздействии нитропрусида натрия.

Впервые показано, что в условиях формирования гиперреактивности лейкотриены усиливают гистаминергические и серотонинергические сократительные реакции, а простагландины и тромбоксаны усиливают серотонинергические реакции и ослабляют гистаминергические реакции.

Установлено, что инкубация гладкомышечных сегментов воздухоносных путей с интерлейкином 4 и интерлейкином 5 приводит к усилению гистаминергических и снижению адренергических реакций, как животных контрольной группы, так и сенсibilизированных.

Показано, что растворимая субъединица рекомбинантного рецептора интерлейкина-5 дозозависимо снижает эффект экзогенного интерлейкина 5, а инкубация с рецептором сегментов воздухоносных путей сенсibilизированных (но не контрольной группы) животных подавляет гистаминергические сократительные реакции.

Впервые выявлено, что величина гиперкалиевого сокращения зависит от степени дезинтеграции элементов цитоскелета: разрушение микротрубочек приводит к увеличению гиперкалиевой контрактуры, а разрушение микрофиламентов – к уменьшению. Показано, что дезинтеграция цитоскелета снижает гистаминергические сократительные реакции гладких мышц воздухоносных путей животных как контрольной группы, так и сенсibilизированных.

Впервые показано, что действие нанодисперсных структур на гиперкалиевую контрактуру сходно с эффектом дезинтегратора цитоскелета колхицина. При воздействии наночастицами CoFe_2O_4 на гладкие мышцы

воздухоносных путей усиливаются и гистаминергические и адренергические реакции.

Научно-практическая значимость

Результаты исследования являются вкладом в развитие фундаментальных знаний об изменении регуляторных механизмов сократительной активности гладких мышц воздухоносных путей при формировании гиперреактивности. Полученные данные дополняют представления о патогенезе бронхиальной гиперреактивности при заболеваниях бронхолегочной системы. Установлено, что ведущим механизмом в формировании гиперреактивности гладких мышц воздухоносных путей является потеря эпителием модулирующего влияния на гладкие мышцы. Результаты проведенных исследований расширяют научную базу для создания новых патогенетически обоснованных средств коррекции бронхоспастических состояний.

Основные положения работы используются в курсах лекций и практических занятиях, проводимых на кафедрах биофизики и функциональной диагностики, нормальной физиологии Сибирского государственного медицинского университета, на кафедре физиологии человека и животных Томского государственного университета.

Методические приемы и полученные данные используются в научных исследованиях, проводимых на кафедрах биофизики и функциональной диагностики, нормальной физиологии, Центральной научно-исследовательской лаборатории Сибирского государственного медицинского университета. Облостями применения полученных научных данных являются физиология, патофизиология, пульмонология, биофизика, фармакология.

Апробация и реализация работы

Основные результаты диссертации обсуждены на всероссийских и международных конгрессах: Международной конференции «Biological motility» (Пушино, 2004), Международном «3-rd Congress of European Region International Union against Tuberculosis and Lung Diseases (IUATLD)» (Москва, 2004), Международном V конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2004), Международном V Сибирском физиологическом съезде (Томск, 2005), Международном VI конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2005), Международном VIII конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2007), научной конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения профессора Е.Ф. Ларина «Нейрогуморальные механизмы регуляции органов пищеварительной системы в норме и при патологии» (Томск, 2007), Международном IX конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2008), Международном VI Сибирском физиологическом съезде (Барнаул, 2008), 4-ой Всероссийской с международным участием школе-конференции по физиологии кровообращения (Москва, 2008), Международном X конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2009), научной

конференции с международным участием, посвященной 120-летию кафедры нормальной физиологии СибГМУ (ТМИ) и кафедры физиологии ТГУ «Нейрогуморальные механизмы регуляции висцеральных органов и систем в норме и при патологии» (Томск, 2009), Международной научно-практической конференции «Здоровье и образование в XXI веке» (Москва, 2009).

Исследования поддержаны грантами РФФИ – «Исследование механизмов регуляции цитоскелетом сократительной активности гладких мышц» (№ 07-04-01184), «Разработка технологии контроля оценки повреждающего действия различных наноматериалов при ингаляционном поступлении» (№09-04-99124-р_офи); ФЦП – «Разработка научно-технологической основы применения лазерных технологий в биомедицинских исследованиях, эффективных методов экспресс-диагностики основных социально-значимых заболеваний респираторной системы человека с использованием методов лазерной спектроскопии» (№02.740.11.0083), «Разработка технологии селективного управления внутриклеточной газовой сигнализацией» (№ 02.740.11.5031), «Разработка технологических основ управления функциональным состоянием клеток на основе идентификации ключевых звеньев трансляции сигналов с участием активных форм кислорода и элементов цитоскелета» (№ П455). Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям (№ 02.438.11.7018).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 69 печатных работ, из них 24 полнотекстовые статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК и одна монография.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 252 страницах машинописного текста и состоит из введения, глав: «Обзор литературы», «Материал и методы исследования», «Результаты исследования», «Обсуждение результатов исследования» и заключения. Библиография включает 333 ссылки, в том числе 99 – работ отечественных авторов и 234 – зарубежных. Работа иллюстрирована 101 рисунком и 1 таблицей.

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации. Автором самостоятельно на основании обзора большого количества литературных данных сформулированы цель и задачи, разработан дизайн исследования.

Автором самостоятельно выполнены эксперименты по изучению сократительной активности сегментов воздухоносных путей морских свинок и исследование состава выдыхаемого воздуха экспериментальных животных.

Автором самостоятельно проведена статистическая обработка результатов, их научный анализ и обсуждение, сформулированы выводы и положения, выносимые на защиту.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили изолированные кольцевые гладкомышечные сегменты главных бронхов половозрелых морских свинок - самцов весом 200-400 г. Всего было использовано 172 особи, на 71 из которых моделировалась гиперреактивность воздухоносных путей (было приготовлено 308 сегментов), 91 особь служила контролем (415 сегментов), 10 подвергались ингаляционному воздействию аэрозоля нанодисперсных частиц (21 сегмент). Были сформированы две экспериментальные группы животных и две контрольные. Животные первой экспериментальной группы сенсибилизировались трехкратными подкожными инъекциями 0,1 мл на 100 г. массы тела животного 0,25% раствора овальбумина в физиологическом растворе (промежуток между инъекциями 3-4 дня). На 21 день животные подвергались ингаляционному воздействию аэрозоля того же раствора. Животные первой контрольной группы подвергались воздействию физиологического раствора по аналогичной схеме. Животные второй экспериментальной группы подвергались ингаляциям нанопорошка CoFe_2O_4 (феррит кобальта) в концентрации 0,05 мг/мл, которые проводились ежедневно в течение 30 минут (курс 4 дня). Животные второй контрольной группы подвергались воздействию дистиллированной воды по аналогичной схеме. Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществлялось в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Методика исследования механического напряжения. Механическое напряжение (МН) кольцевых гладкомышечных сегментов бронхов регистрировали изометрическим датчиком силы FT10G в условиях, близких к изометрическим, при температуре 37 °С в аэрируемом растворе Кребса. Исследования проводились на сегментах с сохраненным эпителием (интактных) и на деэпителизованных сегментах, при этом эпителий удалялся механически вращением деревянного шпателя в просвете сегмента в течение 1 минуты.

Перед началом исследования сегменты тестировались воздействием гиперкалиевого раствора Кребса (40 мМ), амплитуда ответа на который принималась за 100 %. Величины сократительных ответов на воздействие исследуемых соединений оценивались в % от амплитуды этого контрольного сокращения.

Для изучения влияния биологически активных веществ (БАВ) они добавлялись непосредственно в камеру, в которой находились сегменты.

При исследовании влияния ингибитора 5-липоксигеназы AA 861 на сократительную активность воздухоносных путей (ВП), данный ингибитор в концентрации 1 мкМ добавлялся в камеру, в которой находились исследуемые сегменты ВП [E. Titos, J. Clària, A. Planagumà et al., 2003]. Сегменты находились в данном растворе в течение 30 минут, после чего подвергались воздействию БАВ.

Ингибитор циклооксигеназы индометацин в концентрации 10 мкМ добавлялся в камеру по аналогичной схеме [А.К. Larsson, M. Bäck, J. Hjoberg et al., 2005], обработка сегментов происходила в течение 15 минут.

Для изучения влияния интерлейкина (ИЛ) 5, интерлейкина 4 и рецептора интерлейкина 5 деэпителизированные сегменты инкубировались в течение 18 часов в термостате при температуре 25⁰С в среде RPMI-1640 с добавлением интерлейкина 5 в концентрации 0,1 мкг/мл и/или α -субъединицы рецептора интерлейкина 5 в концентрациях 0,1; 0,5 и 1 мкг/мл, интерлейкина 4 в концентрации 0,1 мкг/мл.

Для исследования влияния дезинтеграторов цитоскелета препараты также добавлялись в камеру: колхицин в концентрации 10 мкМ, обработка сегментов продолжалась 90 минут; цитохалазин Д – 1 мкМ и 45 минут [К.В. Adler, J. Krill, T.V. Alberghini et al., 1983; S.S. An, R.E. Laudadio, J. Lai et al., 2002]; нокодазол – 10 мкМ и 60 минут [С.А. Brum, I.D. Duarte, R.C. Webb et al., 2005].

Для изучения влияния взвеси нанодисперсных частиц в камеру, в которой находились сегменты, добавляли CoFe_2O_4 в концентрации 0,3 мг/мл.

Методика исследования аэрозольных сред. Эксперименты по измерению пропускания воздушно-аэрозольными смесями лазерного излучения проводились на базе Института оптики атмосферы Сибирского отделения Российской Академии наук и выполнялись по стандартной спектрофотометрической схеме.

Методика исследования состава выдыхаемого воздуха. Исследования выдыхаемого воздуха проводились на внутривибраторном лазерном оптико-акустическом сенсоре ILPA-1.

Методика исследования количества нитрит-анионов. Содержание оксида азота в гомогенате бронхов морской свинки определяли косвенным методом, по концентрации нитрит-анионов в реакции с реактивом Грисса.

Методика определения циклического гуанозинмонофосфата. Количество циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) в гомогенате бронхов морской свинки определяли иммуноферментным методом с использованием наборов фирмы Biomol international, L.P.

Используемые растворы. Раствор Кребса следующего состава (в мМ): NaCl – 120,4; KCl – 5,9; CaCl_2 – 2,5; MgCl_2 – 1,2; глюкозы – 11,5; трис(оксиметил)-аминометана – 15,5; pH = 7,36±0,01. Аэрация осуществлялась воздухом с помощью компрессионного насоса.

Модифицированные растворы Кребса: гиперкалиевые растворы с концентрацией KCl 40, 60, 80, 100 и 120 мМ.

Тестирующие растворы готовились на основе раствора Кребса и его модификаций с добавлением соответствующих реактивов.

Используемые реактивы: гистамин (производство Россия); сальбутамол (производство Россия); серотонин (ICN Biomedicals, Inc., США); нитропруссид натрия (ICN Biomedicals, Inc., США); нитрозоглутатион (ICN Biomedicals, Inc., США); AA861 (производство Россия); индометацин

(производство Россия); рекомбинантный человеческий интерлейкин 4 (Biosource International, Inc., США); рекомбинантный человеческий интерлейкин 5 (Biosource International, Inc., США); рецептор интерлейкина 5 (R&D Systems Inc., США); овальбумин (egg white) (ICN Biomedicals, Inc., США); колхицин (Sigma, Франция); цитохалазин Д (ICN Biomedicals, Inc., США); нокодазол (ICN Biomedicals, Inc., США); нанопорошок CoFe_2O_4 (произведен методом механохимического синтеза из солевых систем на базе отдела структурной макрокинетики ТНЦ СО РАН).

Статистическая обработка результатов. Анализ данных проводился при помощи программы Statistica 6.0 for Windows фирмы Statsoft. Фактические данные представлены в виде «среднее \pm ошибка среднего» ($\bar{X} \pm m$). Для определения характера распределения полученных данных использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Гипотезу о принадлежности сравниваемых независимых выборок к одной и той же генеральной совокупности или к совокупностям с одинаковыми параметрами проверяли с помощью рангового U - критерия Манна-Уитни. Когда члены сравниваемых выборок были связаны попарно (зависимые выборки), различия между ними оценивали с помощью рангового T-критерия Вилкоксона. Для оценки взаимосвязи полученных результатов использовали критерий Спирмена. Связь между признаками считается статистически значимой, если значения коэффициента ранговой корреляции Спирмена больше 0,5.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1 Особенности эпителиально-гладкомышечных взаимодействий в воздухоносных путях

Известно, что эпителий обладает способностью секретировать различные контракильные и релаксирующие факторы и тем самым модулировать сократительную активность подлежащих гладких мышц (ГМ) ВП. Больше всего обсуждается роль релаксирующего фактора NO, выделяемого эпителием, меньше внимания уделено контракильным агентам. Исследования, направленные на изменение модулирующего действия эпителия при формировании гиперреактивности, в перспективе могут дать основу для понимания процессов, развивающихся при патологии.

Влияние эпителия на сократительную активность подлежащих ГМ ВП оценивали методом сравнения контракильных реакций деэпителизированных сегментов и сегментов с сохраненным эпителием (интактных).

Для исследования контракильных реакций сегментов ВП животной контрольной группы использовался гистамин в концентрациях 0,1 нМ – 100 мкМ. Интактные (n=15) и деэпителизированные (n=9) сегменты отвечали на воздействие гистамина в концентрациях 0,01 мкМ – 100 мкМ дозозависимым сокращением (рис. 1). При этом максимальная амплитуда сокращения деэпителизированных сегментов ($53,65 \pm 1,82$ % относительно контрольного

сокращения) на концентрацию гистамина 100 мкМ была достоверно выше амплитуды сокращения интактных сегментов ($40,96 \pm 2,44$ %, $p < 0,05$).

Похожие результаты были получены при изучении влияния серотонина в концентрациях 10 нМ – 10 мкМ на сократительную активность сегментов ВП животных контрольной группы. У сегментов с сохраненным эпителием серотонин в концентрациях 0,001 мкМ – 10 мкМ не вызывал достоверного дозозависимого увеличения механического напряжения ($n=9$). При изучении воздействия серотонина на деэпителизированные сегменты было выявлено дозозависимое сокращение всех сегментов на концентрации 0,1 мкМ – 10 мкМ ($n=9$). Амплитуда сократительных реакций деэпителизированных сегментов (максимальная амплитуда составила $13 \pm 1,5$ % на концентрацию серотонина 10 мкМ) была достоверно выше амплитуды сократительных реакций интактных сегментов ($p < 0,05$).

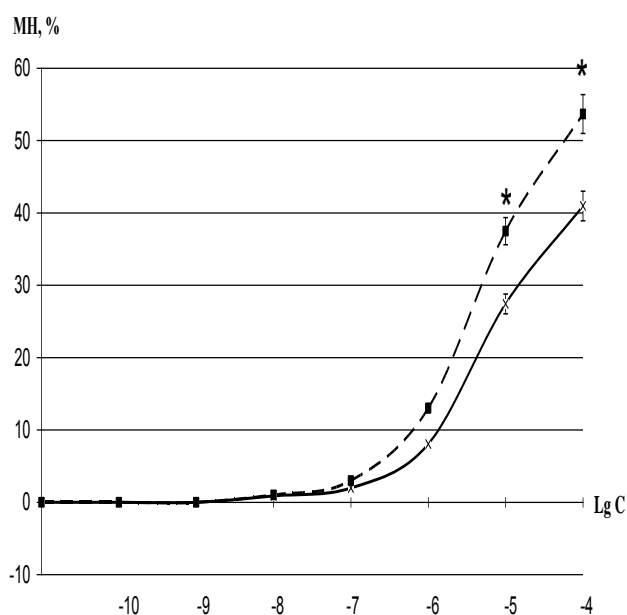


Рисунок 1 – Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок контрольной группы от концентрации гистамина

Сплошная линия – сегменты с сохраненным эпителием.

Пунктирная линия – сегменты без эпителия.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации гистамина (Lg C).

* – достоверность различий в амплитудах сократительных реакций сегментов с сохраненным эпителием и без эпителия.

В норме тонус гладких мышц бронхов в основном определяется динамическим балансом образующегося в эпителии оксида азота и секретируемых тучными клетками гистамина и серотонина, то есть при действии данных медиаторов эпителий может вырабатывать релаксирующие факторы, такие как оксид азота, и тем самым уменьшать амплитуду контрактивных реакций [L.A. Cohn, K.B. Adler, 1992].

Для исследования дилатационных реакций сегментов ВП животных контрольно группы был использован сальбутамол в концентрациях 0,01 нМ – 10 мкМ. Предварительно интактные сегменты предсокращались гиперкалиевым раствором (40 мМ), на фоне которого проводилось воздействие сальбутамола. Интактные ($n=14$) и деэпителизированные ($n=11$)

сегменты отвечали дозозависимым расслаблением на воздействие сальбутамола в концентрациях 0,01 нМ – 10 мкМ. При этом степень расслабления на воздействие сальбутамола была достоверно больше у деэпителизированных сегментов: максимальное расслабление на концентрацию сальбутамола 10 мкМ составила $59,59 \pm 3,05$ % от амплитуды предсокращения (100 %) по сравнению с максимальным расслаблением интактных сегментов – $81,42 \pm 2,66$ % ($p < 0,05$). Таким образом, удаление эпителия приводило к усилению дилатационных реакций сегментов ВП морских свинок контрольной группы.

В следующей серии экспериментов исследовалось влияние сальбутамола на механическое напряжение сегментов, предсокращенных гистамином в концентрации 100 мкМ. Интактные ($n=10$) и деэпителизированные ($n=12$) сегменты отвечали дозозависимым расслаблением на воздействие сальбутамола в концентрациях 0,01 нМ – 10 мкМ. Реакция адренергического расслабления была более выражена у интактных сегментов по сравнению с деэпителизированными ($p < 0,05$): максимальная амплитуда расслабления интактных сегментов составила $-18,06 \pm 1,02$ % (от амплитуды предсокращения на гистамин), деэпителизированных – $10,94 \pm 0,46$ %.

Таким образом, вклад эпителия в реализацию адренергических реакций гладких мышц ВП зависит от вида предсокращающего фактора. В случае, когда предобработка гладких мышц осуществляется с помощью гистамина, амплитуда дилатационного ответа в присутствии эпителия увеличивается. Релаксирующий эффект складывается из ц-АМФ-зависимой релаксации собственно гладких мышц и дополнительного воздействия на гладкие мышцы эпителиального релаксирующего фактора [Анфиногенова Я.Д., 1997]. В случае предсокращения сегментов гиперкалиевым раствором Кребса дилатационные реакции в присутствии эпителия снижаются, что может быть обусловлено антагонизмом кальциевой сигнальной системы и ц-АМФ-зависимого пути регуляции сократительной активности.

Объяснение данных результатов может также лежать в области физиологической роли предсокращающих факторов: гистамин как главный медиатор при воспалительных реакциях вызывает выделение эпителием релаксирующих факторов, гиперкалиевый раствор не является физиологичным, поэтому может вызывать противоположную реакцию эпителия, сопровождающуюся выделением констрикторов.

Возможно, что дисбаланс дилатационных и констрикторных факторов эпителия приводит к формированию такого состояния, как гиперреактивность ВП.

Воздействие гистамина в концентрациях 0,1 мкМ – 100 мкМ вызывало дозозависимое сокращение интактных ($n=13$) и деэпителизированных ($n=18$) сегментов ВП животных экспериментальной группы (рисунок 1). Максимальная амплитуда сокращения на концентрацию гистамина 100 мкМ составила $73,36 \pm 5,32$ % у интактных сегментов и $89,74 \pm 6,49$ % у деэпителизированных

сегментов, достоверных различий между данными группами обнаружено не было.

Серотонин также вызывал дозозависимое сокращение интактных (n=8) и деэпителизированных (n=10) сегментов ВП сенсibilизированных животных в концентрациях 0,01 мкМ – 10 мкМ. Максимальная амплитуда сокращения регистрировалась на воздействие серотонина в концентрации 10 мкМ и составляла $15,4 \pm 1,1$ % для интактных сегментов и $18,5 \pm 1,2$ % для деэпителизированных сегментов. Достоверных различий между интактными и деэпителизированными сегментами также обнаружено не было.

Сальбутамол в концентрациях 0,01 нМ – 10 мкМ вызывал дилатацию всех исследуемых сегментов ВП сенсibilизированных животных. В случае предсокращения гиперкалиевым раствором Кребса механическое напряжение интактных сегментов снижалось до $70,42 \pm 2,06$ % от амплитуды предсокращения (n=8), механическое напряжение деэпителизированных сегментов – до $77,99 \pm 3,41$ % от амплитуды предсокращения (n=14). Достоверных различий обнаружено не было. В случае предсокращения гистамином механическое напряжение интактных сегментов снижалось до $3,86 \pm 0,22$ % (n=8) от амплитуды предсокращения на 100 мкМ гистамина, деэпителизированных сегментов – до $5,59 \pm 0,48$ % (n=12), достоверные различия также были не выявлены.

Таким образом, модулирующая роль эпителия на сократительные реакции ГМ ВП в условиях формирования гиперреактивности нивелируется. Вероятно, это связано с тем, что при сенсibilизации морских свинок овальбумином происходит нарушение целостности эпителиального пласта, возникают необратимые органические изменения стенки ВП: на гистологических препаратах обнаруживаются преобладание эпителиоцитов с признаками дистрофии, скопление отечной жидкости под базальной мембраной и периваскулярно, гипертрофия мышечных волокон [Е.А. Геренг и др., 2004], что похоже на картину, наблюдающуюся у пациентов с бронхиальной астмой [S. Al-Muhsen, J.R. Johnson, Q. Hamid, 2011]. Такие изменения могут вести к дефициту секреторирующей функции эпителия, либо к дисбалансу выделяющихся контрактивных и релаксирующих факторов.

2 Изменение механизмов нитроксидагической бронхорелаксации в условиях формирования гиперреактивности

Большинство исследователей считает, что эпителий так же, как эндотелий, выделяет эпителиальный релаксирующий фактор, однако при сенсibilизации возникает дефицит его образования, что приводит к снижению NO-зависимой бронхорелаксации [Р.И. Сепиашвили, М.Г. Шубич, В.Б. Карпюк, 2003]. Тем не менее, количество NO в выдыхаемом воздухе у людей больных бронхиальной астмой при обострении заболевания увеличивается [В.А. Невзорова, 1997].

Для оценки NO-продуцирующей функции дыхательных путей морских свинок были проведены исследования концентрации нитрит-анионов в бронхах морских свинок. Оказалось, что их концентрация у

сенсibilизированных животных была увеличена в 2,43 раз по сравнению с животными контрольной группы ($p < 0,05$). На фоне увеличения концентрации нитрит-анионов также было выявлено, что содержание цГМФ в респираторном тракте у сенсibilизированных морских свинок было достоверно выше в 1,47 раз, чем у животных контрольной группы ($p < 0,05$). Следует отметить, что была выявлена статистически достоверная положительная корреляция ($r = 0,5$; $p < 0,01$) между параметрами, характеризующими NO-продуцирующую функцию дыхательных путей и уровнем цГМФ.

Кроме того, исследования выдыхаемого воздуха также подтвердили, что продукция NO в ВП при сенсibilизации увеличивается. В группе животных после сенсibilизации было обнаружено достоверное увеличение коэффициентов поглощения, соответствующие длинам волн 10,44 мкм, 10,14 мкм. Эти длины волн соответствуют линиям поглощения метаболитов оксида азота N_2O и NO_2 (коэффициенты поглощения для группы контроля составили: 0,1581 и 0,0803 соответственно, для экспериментальной группы: 0,2291 и 0,1171).

В связи с этим были проведены эксперименты по исследованию влияния окиси азота на сократительные реакции деэпителизированных сегментов ВП животных в норме и в условиях сенсibilизации. В качестве донаторов окиси азота были выбраны нитрозоглутатион и нитропруссид натрия. Влияние донаторов оксида азота оценивали на фоне предсокращения сегментов гиперкалиевым раствором Кребса.

Было показано, что нитропруссид натрия в концентрациях от 10 нМ до 100 мкМ вызывал дозозависимое расслабление всех сегментов, полученных от животных контрольной группы. Максимальная амплитуда расслабления на воздействие нитропрussa натрия (100 мкМ) составила $85,3 \pm 5,1$ % ($n = 8$) от амплитуды предсокращения. При этом максимальная амплитуда дилатационных реакций сегменты бронхов сенсibilизированных животных была достоверно больше ($p < 0,05$) и составила $65,3 \pm 4,5$ % ($n = 21$) от амплитуды предсокращения.

Механизм действия нитропрussa натрия связывают с молекулой NO, высвобождающейся из этого комплекса. При этом считается, что и NO и оставшаяся часть нитропрussa натрия проникают через цитоплазматическую мембрану. Под влиянием NO происходит увеличение уровня цГМФ, что ведет к удалению ионов Ca^{2+} из клетки [В.В. Рекалов, В.В. Тараненко, М.Ф.Шуба, 1985], активации калиевой проводимости [М.Б. Баскаков и др., 1996] и как следствие – развитию релаксации.

Эксперименты с нитрозоглутатионом показали, что он вызывает дозозависимое расслабление сегментов ВП животных контрольной (рис. 2) и экспериментальной групп во всем диапазоне концентраций (1 нМ – 100 мкМ).

Максимальная амплитуда расслабления ГМК сегментов ВП животных контрольной группы составила $58,2 \pm 3,5$ % ($n = 6$) от амплитуды

предсокращения. При этом максимальная амплитуда расслабления сегментов ВП животных экспериментальной группы (n=10) была достоверно ниже ($p < 0,05$) и составила $83,5 \pm 4,2$ % от амплитуды предсокращения.

Дозозависимое расслабление ГМ ВП, наблюдающееся при воздействии нитрозоглутатиона, можно объяснить также с эффектом воздействия молекулы NO, высвобождающейся из данного соединения. Сам глутатион проникать через мембрану не может. Сенсбилизация сопровождается возникновением окислительного стресса и усилением активности ферментов антиоксидантной защиты. В клетке таким соединением является глутатион. Соответственно, количество свободного глутатиона в ГМК при формировании гиперреактивности уменьшается [А.В. Носарев, 2006; J. Kloek, E. Mortaz, I. Van Ark et al., 2010], следовательно, формируется нехватка глутатиона для связи с пришедшим извне NO (экзогенный нитрозоглутатион).

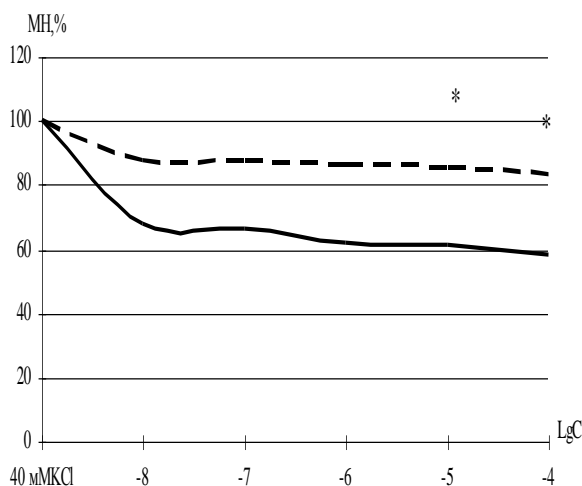


Рисунок 2 – Зависимость механического напряжения гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, от концентрации нитрозоглутатиона

Пунктирная линия - сегменты ВП морских свинок в состоянии гиперреактивности бронхов.

Сплошная линия – сегменты бронхов морских свинок контрольной группы.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН %).

По оси абсцисс десятичный логарифм концентрации нитрозоглутатиона (Lg C).

* - достоверность различий между амплитудами расслабления сегментов животных контрольной группы и в условиях формирования гиперреактивности ($p < 0,05$).

Кроме того, существуют данные о том, что при формировании бронхиальной астмы у людей метаболизм NO смещается в сторону образования пероксинитрита, так как уменьшается активность глутатион-S-трансферазы [Л.М. Огородова, 2009]. Пероксинитрит сам способен вызывать контракильные реакции гладких мышц. Все это приводит к уменьшению дилатационных реакций на воздействие экзогенного нитрозоглутатиона при формировании гиперреактивности.

3 Влияние эйкозаноидов на сократительные реакции гладких мышц воздухоносных путей в условиях формирования гиперреактивности

Результаты, полученные при исследовании влияния эпителия на адренергическое расслабление ГМ ВП и имеющие зависимость от вида предсокращающего фактора, могут быть связаны с тем, что биологически активные вещества реализуют свое действие с вовлечением фосфоинозитидного пути регуляции сократительной активности ГМ.

Используя ингибиторы циклооксигеназы, можно считать, что работает только липоксигеназный путь и реализуются эффекты лейкотриенов и липоксинов. И наоборот, блокируя липоксигеназу, можно увидеть действие простагландинов, простациклинов и тромбоксанов.

В первой серии экспериментов исследовали влияние гистамина в концентрациях 10 нМ – 10 мкМ на сократительную активность гладких мышц сегментов ВП морских свинок контрольной группы после предобработки ингибитором липоксигеназы АА 861 в концентрации 1 мкМ. Гладкомышечные сегменты отвечали дозозависимым сокращением на всем диапазоне концентраций, при этом максимальная амплитуда сокращения на 10 мкМ гистамина составила $69,4 \pm 4,4$ % ($n=10$), что было достоверно больше (на 31,9 %) величины амплитуды сокращения гладких мышц при воздействии гистамином на базальный тонус ГМК сегментов ВП ($p < 0,05$).

Похожие результаты были получены при исследовании влияния серотонина в концентрациях 10 нМ – 10 мкМ на сегменты ВП животных контрольной группы, предобработанные ингибитором липоксигеназы АА 861 в концентрации 1 мкМ. Было обнаружено, что сегменты отвечают дозозависимым сокращением. Максимальная амплитуда реакции гладких мышц на концентрацию 10 мкМ составила $51,9 \pm 5,4$ % ($n=10$). При этом на концентрацию серотонина 10 мкМ амплитуда сократительных реакций гладких мышц, предобработанных АА 861, была достоверно выше на 38,9 % ($p < 0,05$) амплитуды сокращения гладких мышц при воздействии серотонином на базальный тонус (рис. 3).

Таким образом, при воздействии на гладкие мышцы таких констрикторов, как гистамин и серотонин, после предобработки ингибитором липоксигеназы происходит увеличение сократительного ответа сегментов ВП животных контрольной группы.

Однако, при воздействии гистамина на гладкомышечные сегменты ВП морских свинок, обработанные ингибитором липоксигеназы АА 861, в условиях формирования гиперреактивности амплитуда сокращения на 10 мкМ гистамина составила $35,7 \pm 2,3$ % ($n=10$), что на 14,8 % меньше амплитуды сокращения при воздействии гистамином на базальный тонус ГМК сегментов ВП ($p < 0,05$).

При воздействии серотонина амплитуда сократительного ответа сегментов ВП экспериментальной группы, обработанных ингибитором липоксигеназы АА 861, составила $33,3 \pm 3,2$ % ($n=10$), что на 14,7 % больше

амплитуды сокращения гладких мышц при воздействии серотонином на базальный тонус ГМК ($p < 0,05$).

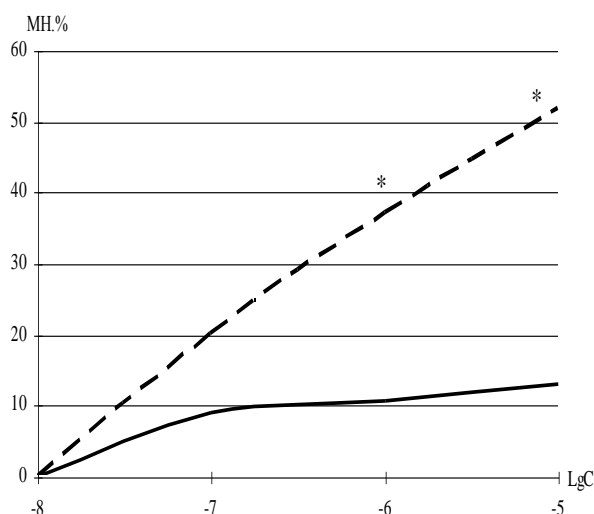


Рисунок 3 – Зависимость механического напряжения гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок контрольной группы от концентрации серотонина

Сплошная линия – сегменты ВП морских свинок без предобработки ингибитором липоксигеназы (АА 861).

Пунктирная линия – сегменты ВП морских свинок после предобработки АА861.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации серотонина (Lg C).

* - достоверность различий в амплитудах сократительных реакций сегментов морских свинок ($p < 0,05$).

Таким образом, при сенсibilизации эффекты неоднозначны: гистаминергический сократительный ответ снижается, серотонинергический – повышается. Такой результат может быть объяснен исходным состоянием ВП. Хотя экзогенные простагландины обычно подавляют аллергические реакции, роль простагландинов как природных эндогенных регуляторов иммунного ответа и воспаления неясна. Имеются данные о том, что простагландины вызывают релаксацию [V. Schlemper et al., 2005; R.S. Lan et al., 2001] и сокращение ВП [L. Pang, E. Holland, A.J. Knox, 1998; D. Schaafsma et al., 2005], что зависит от типа простагландинов: ПГ-В₂, ПГ-F₂α, ПГ-D₂ сокращают гладкие мышцы бронхов, тогда как ПГ-E₂ расслабляет их [K. Decker, 1994; L.J. Janssen et al., 2000; A. Shiraki, H. Kume, T. Oguma et al., 2009].

Это может быть связано с тем, что гистамин в отличие от серотонина является основным медиатором, регулирующим тонус ГМ ВП в состоянии гиперреактивности. У животных контрольной группы система метаболизма арахидоновой кислоты не активна, поэтому ее стимуляция гистамином приводит к увеличенному по сравнению с экспериментальной группой эффекту. У сенсibilизированных животных простагландины, возможно, действуют через цАМФ, снижая констрикторный эффект. При стимуляции серотонином простагландины в условиях гиперспастического состояния вовлекаются в сократительный ответ. Возможно, что стимуляция гистамином

приводит к большей наработке ПГ-Е₂, а серотонином – ПГ-В₂, ПГ-Д₂ или ПГ-Е₂α.

В следующей серии экспериментов исследовали особенности влияния ингибитора циклооксигеназы индометацина на сократительную активность ГМ ВП морских свинок.

После предобработки индометацином сегменты ВП животных контрольной группы на воздействие гистамина отвечали дозозависимым сокращением. Максимальная амплитуда на концентрацию гистамина 10 мкМ была равной 74,5±5,5 % (n=10), что на 24,1 % превышала амплитуду сокращения ГМ ВП при действии гистамина на базальный тонус ГМК (p<0,05).

Подобное увеличение максимальной амплитуды сокращения наблюдалось также у сегментов ВП животных контрольной группы, предобработанных индометацином, при воздействии на них серотонина в концентрациях 0,1 мкМ – 10 мкМ. Максимальная амплитуда сократительных реакций предобработанных индометацином сегментов на максимальную концентрацию серотонина (10 мкМ) составила 51,5±4,4 %, что на 35,5 % было выше амплитуды сокращения сегментов при действии серотонина без предобработки индометацином (p<0,05).

После предобработки гладких мышц ингибитором циклооксигеназы индометацином происходит увеличение сократительного ответа ГМ ВП и на гистаминергическое воздействие, и на серотонинергическое. Возможно, полученные результаты связаны с тем, что при ингибировании циклооксигеназы происходит активация липоксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты, что приводит к наработке лейкотриенов, которые являются мощными констрикторами.

Гладкомышечные сегменты в условиях гиперреактивности после предобработки индометацином (10 мкМ), на воздействие гистамина также отвечали дозозависимым сокращением. Максимальная амплитуда сокращения гладких мышц на концентрацию гистамина 10 мкМ составила 125,8±6,5 % (n=18). Полученное сокращение на 75,3 % (p<0,05) было достоверно больше амплитуды сокращения гладких мышц при воздействии гистамина на базальный тонус ГМК сегментов ВП (p<0,05).

При воздействии серотонина сегменты ВП животных экспериментальной группы, обработанные индометацином, отвечали дозозависимым сокращением, максимальная амплитуда при этом была достоверно больше на 21,9 % (p<0,05) амплитуды сокращения сегментов без обработки индометацином и составила 40,4±3,8 % (n=8).

При формировании гиперреактивности сократительные реакции ГМ на воздействие гистамина и серотонина увеличиваются. Известно, что при сенсibilизации метаболизм арахидоновой кислоты смещается в сторону наработки лейкотриенов, что способствует формированию гиперспастического состояния [Л.С. Булкина, А.Г. Чучалин, 1998; Z. Diamant et al., 1999]. Если в этих условиях заблокировать конкурентный путь

наработки простагландинов, то констрикторный эффект медиаторов усиливается, дополненный действием лейкотриенов.

При изучении адренергических реакций сегментов ВП в условиях блокирования путей метаболизма арахидоновой кислоты были получены следующие результаты.

Сегменты ВП морских свинок предобрабатывались ингибитором липоксигеназы АА 861 в концентрации 1 мкМ, после чего предсокращались гистамином (100 мкМ), на фоне которого происходило воздействие салбутамола.

Салбутамола в концентрациях 0,01 нМ – 10 мкМ вызывал дозозависимое расслабление всех исследуемых сегментов ВП животных контрольной группы (n=12). Максимальная амплитуда расслабления на концентрацию салбутамола 10 мкМ составила $13,81 \pm 0,4\%$ от предсокращения. При этом наблюдалось достоверное снижение дилатационных реакций ($p < 0,05$) при предобработке сегментов АА 861.

Такой же эффект был получен при исследовании адренергических реакций сегментов ВП животных экспериментальной группы. Салбутамола в концентрациях 0,01 нМ – 10 мкМ вызывал дозозависимое расслабление исследуемых сегментов, максимальная амплитуда расслабления на концентрацию салбутамола 10 мкМ составила $-2,81 \pm 0,08\%$ от амплитуды предсокращения (n=14). Предобработка АА 861 достоверно снижала дилатационный эффект салбутамола ($p < 0,05$).

Для исследования влияния индометацина на адренергические реакции сегменты предобрабатывали индометацином, затем предсокращали гистамином (100 мкМ), на фоне которого проводили воздействие салбутамолом.

Салбутамола в концентрациях 0,01 нМ – 10 мкМ вызывал дозозависимое расслабление сегментов ВП морских свинок контрольной группы, максимальная амплитуда расслабления на концентрацию салбутамола 10 мкМ составила $-2,81 \pm 0,08\%$ от амплитуды предсокращения (n=14). Предобработка индометацином достоверно снижала дилатационный эффект салбутамола ($p < 0,05$).

Таким образом, при влиянии как ингибитора липоксигеназы, так и ингибитора циклооксигеназы расслабление на релаксанты снижается. Видимо, простагландины и лейкотриены препятствуют реализации цАМФ-зависимого пути, запускаемого β -адреномиметиками.

Подводя итог, можно сделать вывод, что основной медиатор воспаления гистамин, оказывающий наибольшее влияние на тонус ГМ ВП, может играть важную роль в формировании состояния гиперреактивности, вовлекая в сократительный ответ и простагландины и лейкотриены, которые к тому же снижают выраженность дилатационных реакций. Возможно, что снижение дилатационных реакций на адренергические воздействия при сенсibilизации объясняется не только снижением количества рецепторов,

как предполагалось ранее, но также усиленной нагрузкой простагландинов, лейкотриенов и тромбоксанов.

4 Роль цитокинов в регуляции тонуса воздухоносных путей в условиях формирования гиперреактивности

Кроме эйкозаноидов, оказывающих влияние на механическое напряжение гладких мышц, существует группа соединений, активирующихся при патологических процессах и способных влиять на тонус гладких мышц – цитокины. При сенсбилизации активируется Th-2-путь, и клетки выделяют ИЛ-3, -4, -5, -6, -9 и -13. Способностью изменять тонус бронхиальных мышц обладает ИЛ-4, однако в последние годы все больше внимания уделяется ИЛ-5, отвечающему за рост и развитие эозинофилов.

В первой серии экспериментов было изучено непосредственное влияние ИЛ-5 на тонус сегментов ВП животных обеих групп. Для этого ИЛ-5 добавляли в кювету с сегментами в концентрациях 1 пг/мл, 0,01нг/мл, 0,1нг/мл, 1 нг/мл и 0,01мкг/мл. Было установлено, что ИЛ-5 в указанных концентрациях не оказывал влияния на механическое напряжение сегментов.

Это подтверждается исследованием влияния ИЛ-5 на реактивность ВП при его ингаляции [Н.-Z. Shi et al., 1998]. При ингалировании ИЛ-5 людям с легкой степенью астмы показатели спирометрии оставались прежними, как до ингаляции.

Для проведения второй серии экспериментов изолированные деэпителизированные сегменты предварительно в течение 18 часов инкубировали в термостате при температуре 25⁰С в среде RPMI-1640 с добавлением ИЛ-5 (концентрация 0,1 мкг/мл). После этого сегменты тестировались воздействием гистамина и сальбутамола, аналогично тому, как это было описано выше.

Инкубация с ИЛ-5 приводила к существенному увеличению амплитуды сократительных реакций гладких мышц бронхов на воздействие гистамина как у сенсбилизированных животных, так и у животных контрольной группы. Было выявлено повышение амплитуды сокращения на воздействие гистамина в концентрациях 10 и 100 мкМ как в контрольной ($p < 0,05$, $n = 13$), так и в экспериментальной группах ($p < 0,05$, $n = 9$). Максимальная амплитуда сокращения сегментов ВП, полученных от животных контрольной группы, составила $53,65 \pm 1,82$ %, ($n = 8$), после инкубации с ИЛ-5 – $98,37 \pm 6,45$ % ($n = 13$). Максимальная амплитуда сокращения сегментов гладких мышц бронхов, полученных от животных экспериментальной группы, составила $89,74 \pm 6,49$ %, ($n = 18$), а сегментов, инкубированных с ИЛ-5 – $115,19 \pm 6,23$ % ($n = 9$).

В следующей серии экспериментов было изучено влияние ИЛ-5 на дилатационные реакции ГМ бронхов при действии на них сальбутамола.

При воздействии сальбутамола на инкубированные с ИЛ-5 сегменты, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса, наблюдалось уменьшение степени расслабления как в контрольной, так и в экспериментальной группе.

В контрольной группе степень расслабления достоверно уменьшалась при инкубации с ИЛ-5 на концентрации сальбутамола 1 мкМ ($p < 0,05$, $n=6$) и 10 мкМ ($p < 0,05$, $n=6$). У сегментов ВП сенсibilизированных животных, инкубированных с ИЛ-5, амплитуда расслабления сегментов была меньше на концентрации сальбутамола 0,1 мкМ ($p < 0,05$, $n=6$), 1 мкМ/мл ($p < 0,05$, $n=6$) и 10 мкМ ($p < 0,05$, $n=6$).

Таким образом, инкубация сегментов с ИЛ-5 приводит к значительному повышению их реактивности на гистамин и, вместе с тем, к уменьшению амплитуды релаксирующих ответов на воздействие сальбутамола, причем как сегментов ВП животных контрольной группы, так и сенсibilизированных. Можно предположить, что ИЛ-5 оказывает непосредственное влияние на функциональное состояние гладких мышц бронхиальной стенки. Действие этого цитокина может опосредоваться через рецепторный комплекс. Рецепторы к ИЛ-5 найдены в ГМ ВП [Y. Bi, Z. Yang, C. Wang, 1999]. Значит, взаимодействуя со своими рецепторами ГМ, ИЛ-5 посредством неизвестных на данный момент механизмов может изменять реактивность ГМ на воздействие гистамина. Это может объяснять феномен ИЛ-5-опосредованной бронхиальной гиперреактивности при отсутствии эозинофильного повреждения тканей [A. Koarai, M. Ichinose, S. Ishigaki-Suzuki, 2003; A.D. Kraneveld, F.P. Nijkamp, A.J. Van Oosterhout, 1997]. Более того, ранее было показано, что для развития бронхиальной гиперчувствительности критическими являются ИЛ-5 и ИЛ-4, но не эозинофилы или IgE, то есть ИЛ-5 лиганд-рецепторное взаимодействие на гладких мышцах дыхательных путей может вызывать гиперчувствительность независимо от эозинофил-индуцированного повреждения тканей.

Таким образом, ИЛ-5 является заманчивой терапевтической мишенью. Однако в исследованиях на морских свинках с экспериментальной бронхиальной астмой было замечено, что для блокирования гиперреактивности дыхательных путей необходимы более высокие дозы препаратов моноклональных антител к ИЛ-5, чем для блокирования эозинофильного воспаления [C.L. Elbon, D.V. Jacoby, A.D. Fryer, 1995; Y. Nitoshi, 1991]. Поэтому остается еще один путь для предотвращения возникновения токсических и провоспалительных эффектов, возникающих в результате дегрануляции эозинофилов – необходимо блокировать действие ИЛ-5 на эти клетки, то есть блокировать взаимодействие между ИЛ-5 и рецептором к нему.

Известно, что астма характеризуется повышенной экспрессией рецептора ИЛ-5, образование мРНК мИЛ-5 α повышено у всех больных в периферической крови и мокроте. При тяжелой форме заболевания наблюдается сдвиг в сторону преимущественного образования мРНК мембранносвязанной изоформы [Л.М. Огородова и др., 2006]. Связывание ИЛ-5 можно осуществить, используя растворимую изоформу α -рецептора к ИЛ-5. Для проверки данного предположения проводили инкубацию сегментов в среде с добавлением ИЛ-5 в концентрации 0,1 мкг/мл и α -

субъединицей рецептора ИЛ-5 в концентрациях 0,1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл и 1 мкг/мл.

И в контрольной, и в экспериментальной группах совместное добавление в среду ИЛ-5 и его рецептора приводило к достоверному снижению амплитуды сократительных реакций на воздействие гистамина по сравнению с амплитудами сокращения при инкубации только с ИЛ-5.

У сегментов ВП морских свинок контрольной группы снижение максимальной амплитуды сокращения при концентрации рецептора 1 мкг/мл составило 63,87 % ($p < 0,01$, $n=6$), при концентрации рецептора 5 мкг/мл – 60,68 % ($p < 0,01$, $n=6$) (рис. 69). У сегментов ВП животных экспериментальной группы максимальная амплитуда уменьшилась при концентрации рецептора 1 мкг/мл на 63,6 % ($p < 0,01$, $n=6$), при концентрации 5 мкг/мл – на 54,63 % ($p < 0,01$, $n=6$), при концентрации 1 мкг/мл – 43,32 % ($p < 0,01$, $n=6$) (рис. 70). При этом максимальная амплитуда сокращения сегментов ВП сенсibilизированных животных оставалась выше амплитуды сокращения сегментов ВП животных контрольной группы ($p < 0,05$, $n=6$).

Таким образом, добавление в среду инкубации рекомбинантного рецептора ИЛ-5 частично блокировало эффекты данного цитокина на гиперреактивность бронхов. Связывая экзогенный ИЛ-5, рецептор тем самым уменьшает сократительные реакции сегментов бронхов животных обеих групп (контрольной и экспериментальной) на гистаминергические воздействия. Но амплитуда сократительных реакций сегментов ВП сенсibilизированных животных остается выше по сравнению с контрольной группой. Эти различия между группами свидетельствуют о важном значении исходного состояния сегментов: возможно, что при сенсibilизации количество эндогенного ИЛ-5 повышено настолько, что необходимы более высокие дозы рецептора ИЛ-5 для полного его связывания. Это подтверждается некоторыми данными из литературы, показывающими, что цитокины и их рецепторы могут синтезироваться в гладкомышечных клетках кроликов и людей.

Для подтверждения того, что в сегментах ВП сенсibilизированных животных находится эндогенный ИЛ-5, который влияет на реактивность ВП, были проведены эксперименты с инкубацией сегментов только с α -субъединицей рецептора ИЛ-5.

Инкубацию гладкомышечных сегментов проводили в течение 18 часов при температуре 25⁰С в среде RPMI-1640 с добавлением α -субъединицы рецептора ИЛ-5 в концентрациях 0,1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл и 1 мкг/мл.

На инкубированные сегменты воздействовали гистамином в концентрациях 0,1 нМ - 100 мкМ. При инкубации достоверной разницы между амплитудами сокращения сегментов ВП животных контрольной группы обнаружено не было (рисунок 4). У сегментов ВП сенсibilизированных животных достоверное снижение сократительных реакций наблюдалось при инкубации сегментов с рецептором в концентрации 1 мкг/мл (рис. 4).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что растворимая α -субъединица рецептора ИЛ-5 способна связывать растворенный в окружающей среде ИЛ-5, а также эндогенный ИЛ-5 и тем самым устранять его действие, направленное на повышение гиперреактивности гладких мышц дыхательных путей. Эти данные позволяют обсудить перспективу использования растворимой формы α -субъединицы рецептора ИЛ-5 для блокирования действия ИЛ-5 на клетки, устраняя ИЛ-5-опосредованные эффекты. Такой подход может лечь в основу принципиально нового, патогенетически обоснованного способа коррекции бронхоспастических состояний.

Однако традиционно главным констрикторным цитокином считается не ИЛ-5, а ИЛ-4. Чтобы оценить вклад ИЛ-5 в повышение сократительных реакций, было проведено сравнение его эффекта с воздействием ИЛ-4.

Для проведения экспериментов, изолированные деэпителизированные сегменты предварительно в течение 18 часов инкубировали в термостате при температуре 25⁰С в среде RPMI-1640 с добавлением ИЛ-4 (концентрация 0,1 мкг/мл). После этого сегменты тестировались воздействием гистамина в концентрациях 1 нМ – 10 мкМ.

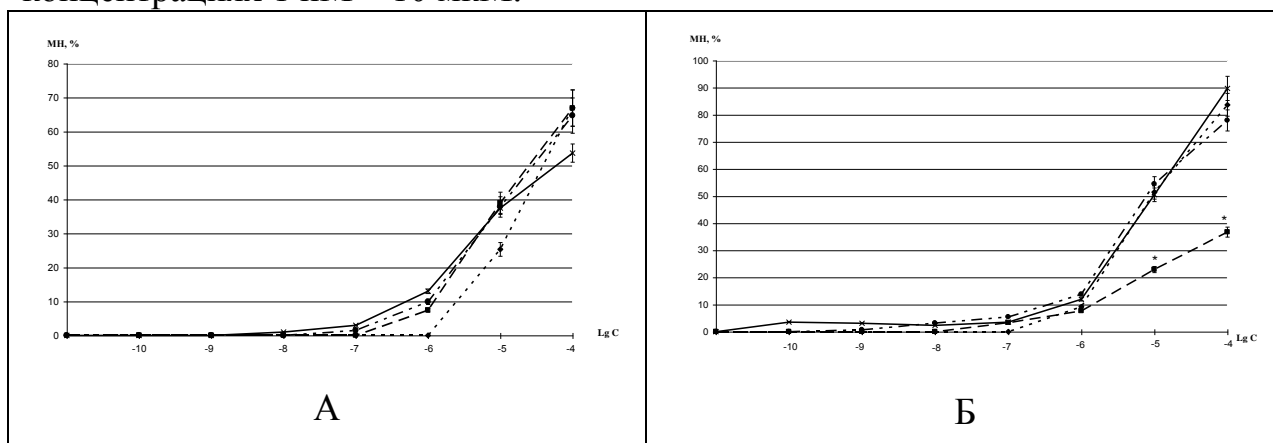


Рисунок 4 – Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок контрольной группы (А) и экспериментальной группы (Б) от концентрации гистамина (эпителий удален)

- — — — — сегменты ВП морских свинок без предобработки рецептором ИЛ-5.
- - ■ - - - сегменты ВП морских свинок контрольной группы, инкубированные с рецептором ИЛ-5 в концентрации 1 мкг/мл.
- . ● - . - сегменты ВП морских свинок контрольной группы, инкубированные с рецептором ИЛ-5 в концентрации 0,5 мкг/мл.
-◆..... сегменты ВП морских свинок контрольной группы, инкубированные с рецептором ИЛ-5 в концентрации 0,1 мкг/мл.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации гистамина (Lg C).

После инкубации сегментов с ИЛ-4 было выявлено повышение амплитуды сокращения на воздействие гистамина в концентрации от 1 до 10

мкМ как гладкомышечных сегментов ВП, выделенных у животных контрольной группы ($p < 0,05$, $n=10$), так и в состоянии гиперреактивности ($p < 0,05$, $n=9$).

Максимальная амплитуда сокращения сегментов ВП, полученных от животных контрольной группы, на воздействие гистамином в концентрации 10 мкМ, составила $37,8 \pm 1,8$ %, ($n=8$). В результате инкубации сегментов ВП с ИЛ-4 наблюдали достоверное повышение амплитуды сокращения – $118,9 \pm 8,4$ % ($p < 0,05$, $n=10$).

Максимальная амплитуда сокращения сегментов ГМ ВП сенсibilизированных животных после инкубации с ИЛ-4 составила $84,4 \pm 4,5$ % ($n=9$), что оказалось на 34 % больше амплитуды сокращения сегментов, не инкубированных с ИЛ-4 ($p < 0,05$).

ИЛ-4, относящийся к группе воспалительных цитокинов, также обладает возможностью воздействия на гладкие мышцы ВП через собственный рецептор. Видимо, инкубация с ИЛ-4 запускает внутриклеточные эффекты, приводящие к увеличению сократительных реакций.

Также было проведено исследование влияния ИЛ-4 на адренергические реакции бронхиальных мышц животных контрольной группы. Инкубация сегментов с ИЛ-4 приводила к уменьшению амплитуды расслабления сегментов ВП. На концентрацию сальбутамола 10 мкМ амплитуда расслабления составила $86,24 \pm 2,51$ % ($n=8$) от амплитуды предсокращения на гиперкалиевый раствор, что было на 16 % меньше амплитуды расслабления сегментов, не инкубированных с ИЛ-4.

При сравнении влияния ИЛ-5 и ИЛ-4 на сократительную активность ГМ ВП были получены следующие результаты. Максимальная амплитуда сокращения сегментов, инкубированных с ИЛ-5, полученных от животных контрольной группы, на воздействие гистамином 10 мкМ составила $58,4 \pm 5,5$ % ($n=13$), после инкубации с ИЛ-4 – $118,9 \pm 8,45$ % ($n=10$). Таким образом, при инкубации гладкомышечных сегментов ВП животных контрольной группы с ИЛ-4 происходит достоверное ($p < 0,05$) увеличение сократительного ответа на гистамин.

Таким образом, влияние исследуемых цитокинов на гистаминергическую сократительную активность сегментов ВП, по всей видимости, зависит от исходного состояния гладких мышц. На гладкомышечные сегменты ВП животных контрольной группы ИЛ-4 оказывает большее потенцирующее влияние, чем ИЛ-5. В условиях формирования гиперреактивности оба интерлейкина оказывают одинаковое влияние: увеличивают сокращение гладких мышц ВП в равной степени. Видимо, у сенсibilизированных животных во время формирования гиперреактивности оба интерлейкина проявляют свою активность и дополнительное инкубирование изолированных сегментов с этими цитокинами не дает существенного прироста амплитуды сокращения. Что

касается адренергической регуляции, то ИЛ-4 и ИЛ-5 в равной степени снижают дилатационные реакции.

5 Исследование роли белков цитоскелета в реализации локальных механизмов регуляции гладких мышц воздухоносных путей морских свинок в физиологических условиях и при формировании гиперреактивности

Исследуемые вещества (гистамин, салбутамол, серотонин) реализуют свое действие через несколько известных путей: активация Ca^{2+} -каналов, фосфоинозитидный путь, влияние на аденилатциклазу и пр. Однако в последнее время все большее внимание уделяется участию в сократительных реакциях мышечных клеток цитоскелета. Согласно данным литературы, цитокины также оказывают свое влияние через цитоскелет [Д.М. Фаллер, Д. Шилдс, 2004]. В связи с этим было проведено исследование различных сократительных реакций сегментов ВП в присутствии дезинтеграторов цитоскелета.

Для влияния на цитоскелет были использованы неселективный дезинтегратор цитоскелета колхицин, селективные дезинтеграторы цитоскелета цитохалазин Д и нокодазол.

В первой серии экспериментов было исследовано влияние колхицина в концентрации 10 мкМ на гиперкалиевое сокращение сегментов ВП животных контрольной группы. Полученные результаты пришлось разделить на две группы: половина исследуемых сегментов отвечала увеличением амплитуды сократительного ответа (рисунок 5) на 41,98 % (n=8, p<0,05), другая половина сегментов – уменьшением на 32,59 % (n=6, p<0,05).

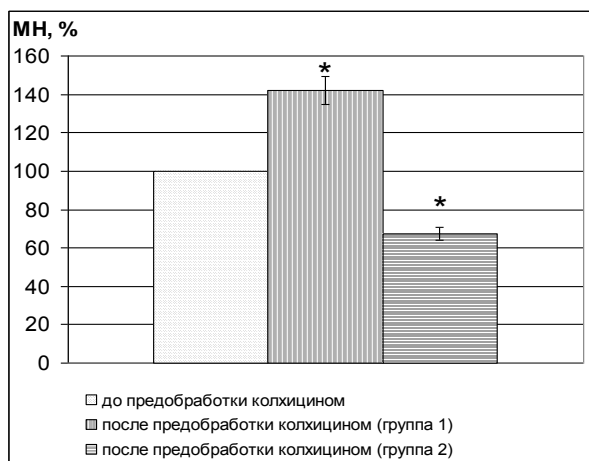


Рисунок 5 – Влияние колхицина на величину гиперкалиевого сокращения сегментов воздухоносных путей животных контрольной группы

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

* - достоверность различий в амплитудах сократительных реакций сегментов, предобработанных колхицином, и интактных (p<0,05).

При проведении аналогичных экспериментов на сегментах ВП сенсibilизированных животных были получены подобные результаты: после предобработки колхицином одна часть сегментов отвечала повышением амплитуды сократительного ответа на воздействие гиперкалиевого раствора на $49,08 \pm 1,7$ % (n=8, p<0,05), другая часть – снижением на $20,64 \pm 1,2$ % (n=6, p<0,05).

Полученные неоднозначные результаты исследования влияния колхицина на гиперкалиевое сокращение сегментов ВП могут быть связаны с тем, что неселективный дезинтегратор цитоскелета колхицин вызывает разрушение различных компонентов цитоскелета в неравнозначной степени. Для проверки выдвинутой гипотезы были проведены эксперименты с селективными дезинтеграторами цитоскелета цитохалазином Д (является дезинтегратором микрофиламентов, использовался в концентрации 1 мкМ) и нокодазолом (является дезинтегратором микротубул, концентрация, взятая для экспериментов – 10 мкМ).

После 45-минутной предобработки цитохалазином Д величина гиперкалиевого сокращения сегментов ВП достоверно уменьшилась ($n=9$, $p<0,05$), после 60-минутной предобработки нокодазолом, амплитуда сократительного ответа достоверно увеличилась ($n=6$, $p<0,05$). Эти данные явились подтверждением выдвинутой гипотезы. Известно, что деполимеризация микротрубочек в артериолах обуславливает вазоконстрикцию артериол, не связанную с повышением внутриклеточной концентрации ионов кальция и не зависимую от эндотелия. Было предложено, что микротрубочки могут участвовать в кальциевой сенситизации сосудистых ГМК, при развитии сократительного ответа [R.J. Paul, P.S. Bowman, M.S. Kolodney, 2000]. Кроме того, было продемонстрировано, что деполимеризация микротрубочек может вести к повышению активности ряда сигнальных протеинов, причем в регуляцию этого процесса вовлекается RhoA/ROCK-зависимый сигнальный путь [K. Chitale, R.C. Webb, 2001; H. Shimokawa et al., 2002]. Таким образом, микротубулы также могут быть вовлечены в релаксирующие реакции гладких мышц ВП. Известно, что с микротрубочками ассоциирован белок высокой молекулярной массы БАМ-2, способный связываться с цАМФ-зависимой протеинкиназой, стимуляция которой приводит к реализации расслабления.

Предобработка сегментов цитохалазином Д, наоборот, приводит к достоверному снижению гиперкалиевого сокращения ВП. Похожие результаты были получены на изолированных артериальных ГМК: обработка артерии цитохалазином Д и латрункулином, ингибиторами полимеризации актиновых филаментов, вела к уменьшению контрактильных реакций, не влияя на концентрацию ионов кальция [L. Shaw et al., 2003]. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о вовлечении актиновых филаментов в сократительные реакции.

В следующей серии экспериментов было исследовано влияние колхицина на сократительные реакции сегментов ВП, вызванные воздействием гистамина. Данное вещество было выбрано как фактор, вызывающий наиболее сильные сократительные ответы по предыдущим данным.

Величина сократительного ответа на действие БАВ без предобработки колхицином принималась за 100 %. После предобработки колхицином

амплитуда сократительного ответа сегментов ВП животных контрольной группы на воздействие гистамина в концентрации 100 мкМ снижалась на $53,3 \pm 4,5$ %; ($n=9$, $p < 0,05$).

Следующим этапом было исследование участия цитоскелета в сократительных реакциях сегментов ВП сенсibilизированных животных, развивающихся в ответ на добавление гистамина в концентрации 0,1 мМ.

Величина сократительного ответа на действие БАВ без предобработки колхицином принималась за 100 %. После предобработки колхицином амплитуда сократительного ответа сегментов ВП на воздействие гистамина снижалась на $21,5 \pm 4,7$ %; ($n=6$, $p < 0,05$).

Таким образом, использование колхицина при исследовании рецептор-зависимых сократительных реакций дает однонаправленные эффекты: снижение величины амплитуды гистаминергических реакций сегментов ВП животных, как контрольной группы, так и экспериментальной. Уменьшение сократительных реакций на воздействие гистамина, вероятно, можно объяснить тем, что данный тип сократительной активности реализуется через фосфоинозитидный путь, а оперирование данного сигнального пути связано с цитоскелетом, следовательно, дезинтеграция цитоскелета может приводить к снижению сократительной активности ГМ сегментов ВП. Исходя из предыдущих результатов, можно сделать предположение о том, что в оперировании фосфоинозитидного пути принимают участие актиновые филаменты цитоскелета.

При формировании гиперреактивности эффект воздействия колхицина на сократительные реакции снижается. Наблюдается уменьшение гистаминергических реакций, однако это снижение почти в два раза слабее, чем у сегментов ВП животных контрольной группы. Эти результаты могут служить косвенным доказательством того, что при сенсibilизации происходит изменение в структуре цитоскелета, поэтому дополнительная дезинтеграция компонентов цитоскелета оказывает незначительное действие. Белки цитоскелета, как и любые белки клетки, закодированы в ДНК и синтезируются на рибосомах. Установлено, что ИЛ-5 может оказывать стимулирующий эффект на экспрессию мРНК *bc1-2* [Л.М. Огорова и др., 2006]. Возможно, что при сенсibilизации ИЛ-5, эффекты которого обсуждались ранее, также способствует увеличенному синтезу белков актина цитоскелета, что в конечном итоге ведет к увеличению сократительных реакций и снижению дилатационных.

6 Механизмы влияния взвеси нанодисперсных структур на сократительные реакции гладких мышц воздухоносных путей морских свинок

Эффекты, схожие с влиянием колхицина на гиперкалиевое сокращение, были получены также при исследовании воздействия нанодисперсных структур на сократительную активность ВП. Наноматериалы в настоящее время широко используются в промышленности, все чаще их стали применять для производства предметов повседневного потребления. Для

частиц более крупных размеров порядка микрометров в организме человека и животных существуют системы элиминации (например, макрофаги, секрет, выделяющийся слизистой и пр.). Наноструктуры, обладая ничтожными размерами, могут быть сравнимы с частями клетки, органоидами, и остается открытым вопрос, какое действие могут оказывать наноматериалы на организм человека. Одним из наиболее вероятных путей попадания наноструктур в организм человека является трахеобронхиальное древо. Поэтому в данной работе проводилось исследование влияние взвеси нанодисперсных структур CoFe_2O_4 *in vivo* (ингаляционное воздействие) и *in vitro* (непосредственное добавление нанопорошка в камеру с изолированными сегментами) на сократительную активность ГМ ВП. CoFe_2O_4 является соединением, не вступающим ни в какие химические реакции в организме. Исследования, проведенные Московским институтом биологии безопасности на культуре клеток, показали, что данное вещество не обладает токсичностью [О.Г. Терехова и др., 2008]. Следовательно, его эффект обусловлен именно нанометровыми размерами.

Первым этапом было определение оптимальной концентрации наночастиц в аэрозоле, которым предполагалось ингалировать экспериментальных животных. Для этого на базе «НИИ Оптики атмосферы» были проведены исследования пропускания лазерного излучения через аэрозоль в зависимости от концентрации нанодисперсных частиц CoFe_2O_4 в растворе. Проводили измерение коэффициента пропускания лазерного излучения через аэрозоли нанопорошков, полученных из растворов разной концентрации. В результате было получено, что максимальное изменение пропускания лазерного излучения аэрозоля из раствора происходило при концентрации нанопорошка в растворе 0,05 мг/мл. Другие же концентрации нанопорошка в растворе оптически не отличались от концентрации аэрозоля чистого растворителя. В связи с этим для ингаляции животных наноматериалом была выбрана концентрация 0,05 мг/мл.

Животных экспериментальной группы подвергали ингаляции нанопорошком, а затем проводили опыты на изолированных кольцевых сегментах ВП вышеописанным способом.

Все исследуемые сегменты отвечали сокращением на воздействие гистамина в концентрациях 0,1 нМ – 100 мкМ, максимальная амплитуда сокращения составила $97,2 \pm 5,3\%$ ($n=13$). При этом на концентрации гистамина 0,1 – 100 мкМ, амплитуда сокращения сегментов экспериментальной группы была достоверно выше ($p < 0,05$) амплитуды сокращения сегментов бронхов животных контрольной группы.

В следующей серии экспериментов было исследовано влияние сальбутамола на деэпителизированные сегменты ингалированных аэрозолем нанодисперсных частиц морских свинок, предсокращенных гистамином. Деэпителизированные сегменты отвечали дозозависимым расслаблением на воздействие сальбутамола в концентрациях 0,01 мкМ – 10 мкМ, максимальная величина расслабления достигала $-79,14 \pm 2,06\%$ от амплитуды

предсокращения ($n=8$). При сравнении изменения механического напряжения интактных сегментов ВП животных контрольной и экспериментальных групп было обнаружено, что в ряду концентраций сальбутамола 0,1 нМ – 10 мкМ амплитуда расслабления у сегментов ВП животных экспериментальной группы была достоверно больше ($p<0,05$ для всех случаев), чем у сегментов ВП морских свинок контрольной группы.

Но так как в организме существуют системы элиминации чужеродных агентов, то также были проведены эксперименты по воздействию нанодисперсных структур на изолированные гладкомышечные сегменты ВП.

Для изучения влияния взвеси нанодисперсных частиц в камеру, в которой находились сегменты, добавляли CoFe_2O_4 в концентрации 0,3 мг/мл. Такая концентрация была определена эмпирически, увеличение концентрации нанопорошка не приводило к изменению результатов.

В первой серии экспериментов исследовали влияние нанопорошка CoFe_2O_4 на сокращение ГМ ВП морских свинок, вызванное гиперкалиевым раствором Кребса.

После предобработки CoFe_2O_4 в ответ на добавление гиперкалиевого раствора одна часть сегментов отвечала увеличением сократительного ответа, другая – уменьшением, поэтому полученные результаты были разделены на две группы. Одна часть сегментов отвечала увеличением амплитуды сокращения на $50,2\pm 2,2\%$ ($n=5$, $p<0,05$), вторая – уменьшением на $22,2\pm 1,4\%$ ($n=6$, $p<0,05$). Похожее разделение результатов было получено при исследовании влияния дезинтегратора цитоскелета. Вероятно, наноструктуры могут действовать на клетку через цитоскелет, нарушая процессы полимеризации – деполимеризации.

Для изучения влияния нанопорошка CoFe_2O_4 на гистаминергическую регуляцию, он добавлялся в камеру (0,3 мг/мл), в которой находились сегменты ВП морских свинок, после чего в камеру добавлялся гистамин в концентрации 0,01 – 100 мкМ. Все сегменты отвечали на воздействие гистамина дозозависимым сокращением. При этом величина сократительного ответа сегментов, обработанных нанопорошком, была достоверно выше на концентрации гистамина 0,1 – 100 мкМ ($n=8$, $p<0,05$) по сравнению с интактными сегментами.

Для изучения влияния нанопорошка CoFe_2O_4 на адренергическую регуляцию, он добавлялся в камеру (0,3 мг/мл), в которой находились сегменты ВП морских свинок, после чего сегменты предсокращались гистамином, затем в камеру добавлялся сальбутамол в концентрации 0,01 нМ – 100 мкМ. Все сегменты отвечали на воздействие сальбутамола дозозависимым расслаблением. При этом величина дилатационного ответа сегментов, обработанных наноматериалом, была достоверно ниже на концентрацию сальбутамола 1 нМ – 100 мкМ ($n=10$, $p<0,05$).

Таким образом, воздействие наночастиц *in vivo* и *in vitro* приводит к однонаправленным результатам: увеличиваются сократительные гистаминергические и дилатационные адренергические реакции. Не

исключено, что нанодисперсные частицы CoFe_2O_4 при ингаляционном введении вызывают неспецифическое воспаление. Нанопорошок может активировать иммунокомпетентные клетки, которые, в свою очередь, выделяя БАВ, такие как интерлейкины, простагландины, лейкотриены, влияют на сократительную активность ВП. Возможно, что наночастицы воздействуют на эпителий ВП, который в ответ на стимуляцию выделяет контракильные и релаксирующие факторы. Также может происходить либо увеличение экспрессии рецепторов к гистамину и сальбутамолу, либо увеличение чувствительности этих рецепторов. Косвенным доказательством этому могут служить данные о том, что лабораторные животные испытывают респираторные проблемы при ингаляции углеродными нанотрубками [D.V. Warheit et al., 2004].

Скорее всего, все эти механизмы реализуются одновременно, приводя, в конечном итоге, к усилению реактивности ГМ ВП на различные раздражители.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования, направленные на изучение изменений внутриклеточных механизмов при различных патологических состояниях остаются на сегодняшний день актуальными. Все конечные проявления патологий на организменном уровне берут свое начало с изменения функционирования структурной единицы всего живого – клетки. Проявлением на уровне организма такого состояния как бронхиальная астма является бронхоспазм, с выраженностью которого связывают степень тяжести заболевания. Применяемая в настоящее время терапия имеет много побочных эффектов, ухудшающих уровень жизни больных. Поэтому фундаментальные исследования изменения механизмов регуляции сократительной активности мышц трахео-бронхиального дерева остаются актуальными. Исследования регуляторных механизмов ГМК при бронхиальной астме могут лечь в основу принципиально нового, патогенетически обоснованного способа коррекции бронхоспастических состояний.

Перспективным путем выяснения упомянутых механизмов является моделирование дисфункции респираторного тракта у экспериментальных животных. В данном исследовании моделью дисфункции респираторного тракта явилась сенсibilизация морских свинок овальбумином.

В результате проведенных экспериментов были получены данные, уточняющие и расширяющие представления об изменении механизмов регуляции гладких мышц воздухоносных путей в условиях формирования гиперреактивности.

Было выяснено, что модулирующее влияние эпителия на аднергическую релаксацию гладких мышц в физиологических условиях (у экспериментальных животных контрольной группы) зависит от вида действующего на эпителий медиатора.

В случае, когда предсокращение гладких мышц осуществляется с помощью гистамина, то присутствие эпителия снижает амплитуду

сократительного ответа. Вклад эпителия в реализацию адренергического расслабления гладких мышц бронхов при высоком гистаминергическим тонусе обусловлен, вероятно, совместной активацией адрено- и гистаминергических механизмов [Я.Д. Анфиногенова, 1997]. Сальбутамол вызывает цАМФ-зависимую релаксацию гладких мышц, на которую накладывается гистаминергическая стимуляция эпителия, выделяющего NO, усиливающий дилатационный ответ.

Если предсокращение проводится гиперкалиевым раствором Кребса, то эпителий, по всей видимости, выделяет констрикторные факторы. На роль выделяемых эпителием факторов констрикции претендуют простаноиды и пептидсодержащие лейкотриены C₄ и E₄ [J.M. Ndukwu et al., 1994].

В условиях формирования гиперреактивности модулирующая роль эпителия нивелируется. Вероятно, это связано с тем, что при сенсibilизации морских свинок овальбумином происходит нарушение целостности эпителиального пласта, возникают необратимые органические изменения стенки воздухоносных путей, это ведет к дефициту секреторирующей функции эпителия, либо к дисбалансу выделяющихся контрактивных и релаксирующих факторов.

Большинство исследователей считает, что фактором, выделяющимся эпителием и обеспечивающим бронхорелаксацию, является оксид азота. Проведенные эксперименты с применением доноров оксида азота – нитропруссид натрия и нитрозоглутатиона – показали различия в реакциях при формировании сенсibilизации. Релаксирующее влияние нитропруссид натрия при сенсibilизации усиливается, а нитрозоглутатиона – угнетается. Возможно, объяснение данного феномена лежит в природе доноров азота. Так как нитрозоглутатион является эндогенным соединением, то в организме существует система его метаболизации. Вероятно, что при сенсibilизации эта система более активна и нитрозоглутатион более эффективно разрушается.

На роль контрактивных факторов, выделяемых эпителиальными клетками, претендуют простаноиды и лейкотриены. Опытные данные, полученные с использованием ингибиторов ключевых ферментов циклооксигеназного и липоксигеназного путей метаболизма арахидоновой кислоты, свидетельствуют о том, что простагландины, тромбоксаны и лейкотриены увеличивают сократительные гистаминергические и серотонинергические реакции. При сенсibilизации эффекты неоднозначны: лейкотриены также усиливают сократительные гистаминергические и серотонинергические реакции, а при действии простагландинов и тромбоксанов гистаминергический сократительный ответ снижается, серотонинергический – повышается. Такой результат может быть объяснен исходным состоянием воздухоносных путей. У животных контрольной группы система метаболизма арахидоновой кислоты не активна, поэтому ее стимуляция гистамином приводит к увеличенному, по сравнению с экспериментальной группой, эффекту. У сенсibilизированных животных

простагландины, возможно, действуют через цАМФ, снижая констрикторный эффект. В условиях гиперспастического состояния простагландины вовлекаются в сократительный ответ на стимуляцию серотонином. Возможно, что стимуляция гистамином приводит к большей выработке ПГ-Е₂, а серотонином – ПГ-В₂.

Что касается дилатационных реакций, то результаты показали, что при влиянии как ингибитора липоксигеназы, так и ингибитора циклооксигеназы расслабление на релаксанты снижается. Причем этот эффект не зависит от вида предсокращающего фактора. Видимо, простагландины и лейкотриены препятствуют реализации цАМФ-зависимого пути, запускаемого β-адреномиметиками.

Кроме эйкозаноидов в последнее время большое внимание уделяется таким соединениям, как цитокины, которые способны модулировать сократительные реакции гладких мышц воздухоносных путей. Проведенные в данной работе исследования убедительно показывают, что инкубация сегментов с ИЛ-5 и ИЛ-4 приводит к значительному повышению их реактивности на гистамин и, вместе с тем, к уменьшению амплитуды релаксирующих ответов на воздействие сальбутамола, причем как сегментов ВП животных контрольной группы, так и сенсibilизированных. Действие данных цитокинов может опосредоваться через рецепторный комплекс. Результаты, полученные с применением растворимой α-субъединицей рецептора ИЛ-5 свидетельствуют о том, что данный рецептор способен связывать растворенный в окружающей среде ИЛ-5, а также эндогенный ИЛ-5 и тем самым устранять его действие, направленное на повышение гиперреактивности гладких мышц дыхательных путей. Эти данные позволяют обсудить перспективу использования растворимой формы α-субъединицы рецептора ИЛ-5 для блокирования действия ИЛ-5 на клетки, устраняя ИЛ-5-опосредованные эффекты. Такой подход может лечь в основу принципиально нового, патогенетически обоснованного способа коррекции бронхоспастических состояний.

Реализацию действия интерлейкинов на клетку связывают с цитоскелетом. При применении неселективного дезинтегратора цитоскелета колхицина величина гиперкалиевого сокращения одной части сегментов увеличивалась, другой части – уменьшалась. В результате применения селективных дезинтеграторов нокодазола и цитохалазина Д было выяснено, что именно актиновые филаменты вовлекаются в сократительные реакции, вызванные гиперкалиевым раствором.

Использование колхицина при исследовании рецептор-зависимых сократительных реакций дало однонаправленные эффекты: снижение величины амплитуды гистаминергических реакций сегментов ВП как контрольной группы, так и экспериментальной. Уменьшение сократительных реакций на воздействие гистамина, вероятно, можно объяснить тем, что данный тип сократительной активности реализуется через фосфоинозитидный путь, а оперирование этого сигнального пути связано с

цитоскелетом, следовательно, дезинтеграция цитоскелета может приводить к снижению сократительной активности ГМ сегментов ВП. Исходя из предыдущих результатов, можно сделать предположение о том, что в оперировании фосфоинозитидного пути принимают участие актиновые филаменты цитоскелета.

При формировании гиперреактивности эффект воздействия колхицина на сократительные реакции снижается. Наблюдается уменьшение гистаминергических реакций, однако это снижение почти в два раза слабее, чем у сегментов бронхов животных контрольной группы. Эти результаты могут служить косвенным доказательством того, что при сенсibilизации происходит изменение в структуре цитоскелета, поэтому дополнительная дезинтеграция компонентов цитоскелета оказывает незначительное действие. Белки цитоскелета, как и любые белки клетки, закодированы в ДНК и синтезируются на рибосомах. Установлено, что ИЛ-5 может оказывать стимулирующий эффект на экспрессию мРНК *bcl-2* [Л.М. Огородова и др., 2006]. Возможно, что при сенсibilизации ИЛ-5, эффекты которого обсуждались ранее, также способствует увеличенному синтезу белков актина цитоскелета, что в конечном итоге способствует увеличению сократительных реакций и снижению дилатационных.

Эффекты, схожие с влиянием колхицина на гиперкалиевое сокращение были получены также при исследовании воздействия нанодисперсных структур на сократительную активность воздухоносных путей. Добавление наноструктур в камеру с сегментами вызывало у одной части сегментов ВП увеличение амплитуды сократительного ответа на воздействие гиперкалиевого раствора, у другой части – уменьшение. Вероятно, наноструктуры могут действовать на клетку через цитоскелет, нарушая процессы полимеризации – деполимеризации. Подтверждением действия наночастиц на цитоскелет является эффект изменения формы эритроцитов в организме при ингаляционном введении ультрадисперсных структур [Н.М. Шевцова и др., 2007].

Влияние нанопорошка на рецептор-зависимые сократительные реакции *in vitro* и *in vivo* было однонаправленным. Ингаляционное воздействие CoFe_2O_4 приводило к усилению сократительных гистаминергических и дилатационных адренергических реакций. Не исключено, что нанодисперсные частицы CoFe_2O_4 при ингаляционном введении вызывают неспецифическое воспаление. Нанопорошок может активировать иммунокомпетентные клетки, которые, в свою очередь, выделяя БАВ, такие как интерлейкины, простагландины, лейкотриены, влияют на сократительную активность воздухоносных путей. Возможно, что наночастицы воздействуют на эпителий воздухоносных путей, который в ответ на стимуляцию выделяет контракильные и релаксирующие факторы. Также может происходить либо увеличение экспрессии рецепторов к гистамину и сальбутамолу, либо увеличение чувствительности этих рецепторов. Косвенным доказательством этому могут служить данные о том, что лабораторные животные испытывают

респираторные проблемы при ингаляции углеродными нанотрубками [D.B. Warheit et al., 2004].

Скорее всего, все эти механизмы реализуются одновременно, приводя, в конечном итоге, к усилению реактивности гладких мышц воздухоносных путей на различные раздражители.

Таким образом, тонус гладких мышц воздухоносных путей в норме зависит от баланса сократительных и релаксирующих факторов. При сенсibilизации происходит усиление сократительных реакций, в этот механизм вовлекаются лейкотриены, простагландины, тромбоксаны, ИЛ-4, ИЛ-5. При этом дилатационные реакции, как адренергические так и нитроксидаергические, снижаются. Кроме того, эпителий, способный снижать сократительные реакции, выделяя эпителиальный релаксирующий фактор, утрачивает модулирующее влияние в условиях формирования гиперреактивности.

ВЫВОДЫ

1. В физиологических условиях эпителий воздухоносных путей угнетает гистаминергические и серотонинергические сократительные реакции гладких мышц. Влияние эпителия на адренергические реакции зависит от характера предсокращающего фактора: в присутствии гистамина эпителий усиливает дилатационные реакции, в присутствии гиперкалиевого раствора – угнетает. В условиях формирования гиперреактивности модулирующее влияние эпителия на сократительные реакции гладких мышц воздухоносных путей не проявляется.

2. В физиологических условиях нитрозоглутатион и нитропруссид натрия вызывают дозозависимую релаксацию гладких мышц воздухоносных путей. В условиях формирования гиперреактивности нитроксидаергические дилатационные реакции, вызванные воздействием нитрозоглутатиона, ослабевают, но усиливаются при действии нитропруссида натрия.

3. При предобработке изолированных сегментов воздухоносных путей животных контрольной группы ингибиторами липоксигеназы и циклооксигеназы усиливаются гистаминергические и серотонинергические сократительные реакции, ослабевают адренергические дилатационные реакции. В условиях формирования гиперреактивности ингибитор циклооксигеназы увеличивает гистаминергические и серотонинергические сократительные реакции, а ингибитор липоксигеназы увеличивает серотонинергические реакции и уменьшает гистаминергические реакции.

4. Инкубация гладкомышечных сегментов с интерлейкином 5 приводит к усилению сократительных гистаминергических и ослаблению дилатационных адренергических реакций как животных контрольной группы, так и сенсibilизированных. Рецептор интерлейкина 5 устраняет эффект экзогенного интерлейкина 5 и уменьшает гистаминергические реакции сегментов воздухоносных путей сенсibilизированных животных. Инкубация изолированных сегментов с интерлейкином 4 приводит к

повышению гистаминергических сократительных реакций воздухоносных путей животных контрольной и экспериментальной групп.

5. Неселективный дезинтегратор цитоскелета колхицин снижает гистаминергические сократительные реакции гладких мышц воздухоносных путей сенсibilизированных и несенсibilизированных животных; на величину гиперкалиевого сокращения влияет неоднозначно: повышает амплитуду сокращения у одной половины сегментов и снижает – у другой половины. Селективный дезинтегратор микротрубочек нокодазол повышает величину гиперкалиевой контрактуры, а селективный дезинтегратор микрофиламентов цтохалазин Д – уменьшает.

6. При ингаляционном введении наночастиц CoFe_2O_4 и воздействии нанопорошка на изолированные сегменты воздухоносных путей наблюдается увеличение амплитуды гистаминергических сократительных и адренергических дилатационных реакций. На гиперкалиевое сокращение взвесь нанодисперсных структур CoFe_2O_4 влияет неоднозначно: половина сегментов отвечает усилением амплитуды сокращения, другая половина – уменьшением.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Дьякова Е.Ю., Федоров Д.А. Роль эндотелия в регуляции гистаминергических сократительных реакций гладких мышц легочной артерии кролика // Вестник Российского государственного медицинского университета. 2001. №2 (17). С. 133.

2. Особенности гистаминергической регуляции гладких мышц легочных артерий кролика / Л.В. Капилевич, Я.Д. Анфиногенова, М.Б. Баскаков, И.В. Ковалев, А.В. Носарев, Е.Ю. Дьякова [и др.] // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. 2001. Т. 152, №8. С.142 – 144.

3. Морфофункциональная характеристика сосудистой стенки легочной артерии кролика / Л.В. Капилевич, А.В. Носарев, Е.Ю. Дьякова [и др.] // «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической морфологии». Томск: СГМУ, 2002. С. 128.

4. Носарев А.В., Дьякова Е.Ю. Особенности регуляции тонуса гладких мышц легочной артерии кролика // Материалы третьего международного конгресса молодых учёных и специалистов “Науки о человеке”. Томск, 2002. С. 186.

5. Особенности регуляции гладких мышц сосудистой стенки легочной артерии кролика / Л.В. Капилевич, А.В. Носарев, Е.Ю. Дьякова [и др.] // **Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова**. 2002. №4. С. 452 – 459.

6. Особенности адренергической регуляции гладких мышц легочных артерий кролика / Л.В. Капилевич, А.В. Носарев, Е.Ю. Дьякова [и др.] // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2002. Том 133, №3. С.254 – 256.

7. Сократительные реакции гладких мышц воздухоносных путей при бронхиальной астме в эксперименте / Л.В. Капилевич, Е.Ю. Дьякова, А.Э. Сазонов [и др.] // **Бюллетень Сибирской медицины: Научно-практический журнал.** Томск: СГМУ, 2003. Т. 2, №1. С. 35 – 38.
8. Дьякова Е.Ю. Сократительные реакции гладких мышц воздухоносных путей при экспериментальной бронхиальной астме // **Вестник Российского государственного медицинского университета.** 2003. №2 (28). С. 164.
9. Дьякова Е.Ю., Высоких Е.В., Носарев А.В. Регуляция сократительной активности гладких мышц воздухоносных путей при модельной бронхиальной астме // **IV конгресс молодых ученых и специалистов “Науки о человеке”.** Томск, 2003. С. 151 – 152.
10. Носарев А.В., Султанова А.Н., Дьякова Е.Ю. Исследование роли циклических нуклеотидов в регуляции механического напряжения сегментов легочных артерий кролика // **IV конгресс молодых ученых и специалистов “Науки о человеке”.** Томск, 2003. С. 167 – 168.
11. Влияние интерлейкина-5 на сократительную активность гладкомышечных препаратов бронхов морских свинок / И.С. Лещёва, Е.Ю. Дьякова, А.П. Копьева [и др.] // **IV конгресс молодых ученых и специалистов “Науки о человеке”.** Томск, 2003. С. 161 – 162.
12. Роль ИЛ-5 в изменении реактивности воздухоносных путей при экспериментальной бронхиальной астме/ Л.В. Капилевич, Е.Ю. Дьякова, А.В. Носарев [и др.] // **Пульмонология, (13 нац. конгресс по болезням органов дыхания).** Москва, 2003. С. 136.
13. Роль цАМФ в регуляции тонуса легочной артерии / Л.В. Капилевич, А.В. Носарев, Е.Ю. Дьякова [и др.] // **Пульмонология, (13 нац. конгресс по болезням органов дыхания).** Москва, 2003. С. 138.
14. Дьякова Е.Ю. Особенности регуляции гладких мышц дыхательного тракта при экспериментальной бронхиальной астме // **4-ая международная научно-практическая конференция “Здоровье и образование в XXI веке”.** Москва, 2003. С. 220 – 221.
15. Роль циклических нуклеотидов в регуляции тонуса легочных артерий кролика / Л.В. Капилевич, А.В. Носарев, И.В. Ковалев, Е.Ю. Дьякова [и др.] // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** 2003. Т. 135, № 6. С. 714 – 718.
16. Морфологические особенности и механизмы регуляции тонуса стенки легочных артерий / Л.В. Капилевич, А.В. Носарев, Е.Ю. Дьякова [и др.] // **Пульмонология.** 2003. Т. 13, №4. С. 51 – 57.
17. Зайцева Т.Н., Дьякова Е.Ю. Изменение сократительной активности гладких мышц воздухоносных путей при действии интерлейкина-5 // **Вестник Российского государственного медицинского университета.** 2004. №3 (34). С.159 – 160.
18. Носарев А.В., Дьякова Е.Ю. Влияние блокаторов фосфодиэстеразы на механическое напряжение гладких мышц легочной

артерии // Вестник Российского государственного медицинского университета. 2004. №3 (34). С. 174.

19. Влияние интерлейкина-5 и рецептора интерлейкина-5 на сократительные реакции гладких мышц воздухоносных путей морских свинок в условиях формирования гиперреактивности / Л.М. Огородова, Л.В. Капилевич, Е.Ю. Дьякова [и др.] // Симпозиум с международным участием, посвященный 115-летию кафедры физиологии Томского государственного университета и Сибирского государственного медицинского университета «Мембранные и молекулярные механизмы регуляции функций гладких мышц». Томск, 2004. С. 32 – 41.

20. Капилевич Л.В., Дьякова Е.Ю., Зайцева Т.Н. Кинетическая модель сократительных реакций гладких мышц воздухоносных путей // Симпозиум с международным участием, посвященный 115-летию кафедры физиологии Томского государственного университета и Сибирского государственного медицинского университета «Мембранные и молекулярные механизмы регуляции функций гладких мышц». Томск, 2004. С. 76 – 79.

21. Капилевич Л.В., Носарев А.В., Дьякова Е.Ю. Особенности регуляции механического напряжения легочных артерий адреномиметиками // Симпозиум с международным участием, посвященный 115-летию кафедры физиологии Томского государственного университета и Сибирского государственного медицинского университета «Мембранные и молекулярные механизмы регуляции функций гладких мышц». Томск, 2004. С. 79 – 80.

22. Геренг Е.А., Сазонов А.Э., Дьякова Е.Ю. Морфологическое состояние слизистой оболочки бронхиального дерева у морских свинок при моделировании астматического приступа // V конгресс молодых ученых и специалистов “Науки о человеке”. Томск, 2004. С. 276.

23. Дьякова Е.Ю., Зайцева Т.Н., Носарев А.В. Эффект гистамина на сократительную активность воздухоносных путей при модельной бронхиальной астме // V конгресс молодых ученых и специалистов “Науки о человеке”. Томск, 2004. С. 282 – 283.

24. Носарев А.В., Давлетьярова К.В., Дьякова Е.Ю. Эффект метиленового синего на сократительную активность гладких мышц легочной артерии при воздействии блокаторов фосфодиэстераз // V конгресс молодых ученых и специалистов “Науки о человеке”. Томск, 2004. С. 308 – 309.

25. Peculiarities of contractile regulation of vascular smooth muscle in rabbit pulmonary artery / L.V. Kapilevich, A.V. Nosarev, Y.J. Anfinogenova, E.Yu. Dyakova // Biological motility. Pushchino, 2004. 142 – 143.

26. The regulation of mechanical tension of pulmonary artery smooth muscle by α - and β -adrenoceptor agonists / L.V. Kapilevich, A.V. Nosarev, E.Yu. Dyakova [et al.] // 3-rd Congress of European Region International Union against Tuberculosis and Lung Diseases (IUATLD). Moscow, 2004. P. 102.

27. Influence of interleukine-5 and interleukine-5 receptor on airway smooth muscle contractility in the experimental model of bronchial asthma / L.V. Kapilevich, E.Yu. Dyakova, T.N. Zaytseva [et al.] // 3-rd Congress of European Region International Union against Tuberculosis and Lung Diseases (IUATLD). Moscow, 2004. P. 187.

28. Сократительные реакции гладких мышц воздухоносных путей при экспериментальной бронхиальной астме: роль интерлейкина 5 в формировании гиперреактивности бронхов / Л.В. Капилевич, Л.М. Огородова, А.Э. Сазонов, Е.Ю. Дьякова [и др.] // **Российский физиологический журнал им. Сеченова И.М.** 2004. Т.90, №10. С.1262 – 1269.

29. Дьякова Е.Ю., Зайцева Т.Н., Носарев А.В. Влияние интерлейкина-5 на адренэргические реакции бронхов при модельной бронхиальной астме // VI конгресс молодых ученых и специалистов “Науки о человеке”. Томск, 2005. С. 73 – 74.

30. Изучение сократительной активности гладких мышц легочных сосудов при сенсibilизации морских свинок овальбумином / А.В. Носарев, Т.Н. Зайцева, К.В. Давлетьярова, Е.Ю. Дьякова // VI конгресс молодых ученых и специалистов “Науки о человеке”. Томск, 2005. С. 79.

31. Сократительные свойства гладких мышц бронхов при формировании гиперреактивности воздухоносных путей / Л.В. Капилевич, Е.Ю. Дьякова, Л.М. Огородова [и др.] // **Российский физиологический журнал им. Сеченова И.М.** 2005. Т.91, №7. С. 832 – 843.

32. Изменение активности глутатион-зависимых ферментов крови при моделировании бронхиальной астмы на морских свинках / Л.В. Капилевич, А.В. Носарев, Т.Н. Зайцева, Е.Ю. Дьякова // Бюллетень Сибирской медицины. Приложение 1 (Тезисы докладов V Сибирского физиологического съезда). 2005. С. 40.

33. Интерлейкин-5 угнетает адренэргическую дилатацию гладких мышц бронхов / Л.В. Капилевич, Е.Ю. Дьякова, Л.М. Огородова [и др.] // Бюллетень Сибирской медицины. Приложение 1 (Тезисы докладов V Сибирского физиологического съезда). 2005. С. 38.

34. Роль респираторного эпителия в формировании гиперреактивности гладких мышц бронхов / Л.В. Капилевич, Е.Ю. Дьякова, Л.М. Огородова [и др.] // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** 2005. Т. 140, №9. С. 250 – 253.

35. Роль интерлейкина-5 в проявлении бронхиальной гиперреактивности (экспериментальное исследование) / А.Э. Сазонов, И.И. Иванчук, Л.В. Капилевич, Е.Ю. Дьякова [и др.] // **Патологическая физиология и экспериментальная терапия.** 2005. №4. С. 20 – 22.

36. Экспериментальные модели в изучении механизмов развития бронхоспастических состояний / Л.В. Капилевич, Е.Ю. Дьякова, Т.Н. Зайцева [и др.] // **Пульмонология.** 2005. №3. С. 112 – 119.

37. Физиологические особенности гладких мышц сосудов малого круга кровообращения / Л.В. Капилевич, А.В. Носарев, И.В. Ковалев, М.Б. Баскаков, Е.Ю. Дьякова [и др.] // **Успехи физиологических наук**. 2006. Т. 37, №1. С. 37 – 49.
38. Влияние нитрозоглутатиона на механическое напряжение гладких мышц легочной артерии и бронхов морских свинок в норме и при сенсibilизации овальбумином / К.В. Давлетьярова, А.В. Носарев, О.С. Левинская, Е.Ю. Дьякова // VII конгресс молодых ученых и специалистов “Науки о человеке”. Томск, 2006. С. 102 – 104.
39. Дьякова Е.Ю., Осипов А.Н., Мельников А.А. Влияние эпителия на адренергические реакции гладких мышц воздухоносных путей // Вестник РГМУ. М.: ГОУ ВПО РГМУ Росздрава, 2006. №2 (49). С. 364.
40. Optical-acoustic spectroscopy of the expired air at a human respiratory pathology / V.G. Ageev, Y.N. Ponjmarev, O.Y. Nikiforova, L.I. Volkova, L.V. Kapilevich, E.Yu. Dyakova [et al.] // XV Symposium on high resolution molecular spectroscopy. Tomsk, 2006. P. 158.
41. Особенности фармакологической чувствительности гладких мышц сосудистой стенки артерий малого круга кровообращения / А.В. Носарев, Л.В. Капилевич, Е.Ю. Дьякова [и др.] // **Экспериментальная и клиническая фармакология**. 2006. Т. 69, №2. С. 22 – 26.
42. Давлетьярова К.В., Носарев А.В., Дьякова Е.Ю. Серотонинэргическая регуляция механического напряжения гладких мышц воздухоносных путей морских свинок в норме и при сенсibilизации // VIII конгресс молодых ученых и специалистов “Науки о человеке”. Томск, 2007. С. 175 – 176.
43. Давлетьярова К.В., Носарев А.В., Дьякова Е.Ю. Влияние ИЛ-4 и ИЛ-5 на сократительную активность гладких мышц воздухоносных путей // VIII конгресс молодых ученых и специалистов “Науки о человеке”. Томск, 2007. С. 176 – 178.
44. Дьякова Е.Ю., Давлетьярова К.В. Влияние нитрозоглутатиона и нитропрусида натрия на механическое напряжение гладких мышц воздухоносных путей морских свинок // **Бюллетень Сибирской медицины: научно-практический журнал**. Томск: СибГМУ, 2007. Т. 6, №2. С. 65 – 67.
45. Дьякова Е.Ю., Капилевич Л.В., Давлетьярова К.В. Исследование влияния ингибитора липоксигеназы на гистаминергическую и серотонинергическую регуляцию воздухоносных путей // **Вестник Томского государственного университета**. 2007. №300(II). С. 137 – 138.
46. Спектральный анализ состава выдыхаемого воздуха сенсibilизированных морских свинок / Л.В. Капилевич, Е.Ю. Дьякова, Ю.В. Кистенев [и др.] // XX съезд физиологического общества имени И.П.Павлова. Москва, 2007. С. 255.
47. Влияние нитрозоглутатиона на сократительные реакции гладких мышц легочной артерии и бронхов морских свинок / Л.В. Капилевич, А.В.

Носарев, К.В. Давлетьярова, Е.Ю. Дьякова // XX съезд физиологического общества имени И.П.Павлова. Москва, 2007. С. 255.

48. Локальная регуляция сократительной активности гладких мышц воздухоносных путей / Л.В. Капилевич, К.В. Давлетьярова, Е.Ю. Дьякова [и др.] // Научная конференция с международным участием, посвященная 100-летию со дня рождения профессора Е.Ф. Ларина «Нейрогуморальные механизмы регуляции органов пищеварительной системы в норме и при патологии». Томск, 2007. С. 56 – 58.

49. Определение параметров состояния окислительного стресса в гладкомышечных клетках при воздействии экзогенного нитрозоглутатиона *in vitro* / Л.В. Капилевич, А.В. Носарев, Е.Ю. Дьякова [и др.] // **Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова**. 2007. Т.93, №8. С. 898 – 904.

50. Диагностика воспалительных процессов в органах дыхания на основе анализа состава выдыхаемого воздуха / Л.В. Капилевич, Ю.Н. Пономарев, Ю.В. Кистенев, Л.М. Огородова, И.В. Ковалев, Е.Ю. Дьякова [и др.] Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2007. 128 с.

51. Спектральный анализ состава выдыхаемого воздуха в условиях формирования гиперреактивности воздухоносных путей / Л.В. Капилевич, Е.Ю. Дьякова, А.В. Носарев и др. // **Пульмонология**. 2007. №6. С. 63 – 66.

52. Особенности адренергических реакций гладких мышц сосудистой стенки легочных артерий морских свинок в условиях сенсibilизации овальбумином / Л.В. Капилевич, А.В. Носарев, Е.Ю. Дьякова [и др.] // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. 2008. Т. 145, №6. С. 617 – 620.

53. Влияние ингаляционного воздействия наноматериалов на сократительную активность гладких мышц воздухоносных путей морских свинок / Е.Ю. Дьякова, А.В. Носарев, А.А. Магаева [и др.] // IX конгресс молодых ученых и специалистов “Науки о человеке”. Томск, 2008. С. 86 – 87.

54. Дьякова Е.Ю., Носарев А.В., Черепанов А.А. Влияние колхицина на сократительную активность гладких мышц легочной артерии и воздухоносных путей морских свинок // IX конгресс молодых ученых и специалистов “Науки о человеке”. Томск, 2008. С. 87 – 88.

55. Влияние нитрозоглутатиона и нитропруссиды натрия на механическое напряжение гладких мышц воздухоносных путей морских свинок / Л.В. Капилевич, А.В. Носарев, Е.Ю. Дьякова [и др.] // VI Сибирский физиологический съезд. Барнаул, 2008. Т.1. С.8 – 9.

56. Влияние нитрозоглутатиона и нитропруссиды натрия на механическое напряжение гладких мышц воздухоносных путей морских свинок / Л.В. Капилевич, К.В. Давлетьярова, А.В. Носарев, Е.Ю. Дьякова [и др.] // 4-я Всероссийская с международным участием школа-конференция по физиологии кровообращения. Москва, МГУ, 2008. С.36 – 37.

57. Specific Adrenergic Responses of Smooth Muscles in the Vascular Wall of Guinea Pig Pulmonary Arteries during Ovalbumin Sensitization / L.V.

Kapilevich, A.V. Nosarev, E.Yu. Djakova [et al.] // Springer Science+Business Media, Inc.- 2008.- 0007-4888/08/1456. P 0673 – 0677.

58. Дьякова Е.Ю. Роль белков цитоскелета в реализации локальных механизмов регуляции сократительной активности гладких мышц воздухоносных путей и сосудов малого круга кровообращения // **Вестник РУДН**. 2008. №7. С. 735 – 737.

59. Влияние перекиси водорода на фенилэфрин-индуцированное сокращение гладких мышц аорты крысы: роль цитоскелета / Л.В. Капилевич, О.В. Мельник, С.В. Гусакова, И.В. Ковалев, М.Б. Баскаков, Е.Ю. Дьякова [и др.] // **Вестник РУДН**. 2008. №7. С. 658 – 660.

60. Влияние ингаляционного введения аэрозоля нанодисперсных частиц на сократительную активность гладких мышц воздухоносных путей морских свинок / Л.В. Капилевич, А.В. Носарев, Е.Ю. Дьякова [и др.] // Научно-практическая конференция «Медико-биологические науки для теоретической и клинической медицины». Москва, 2008. С. 48 – 49.

61. Влияние ингаляционного воздействия взвеси нанодисперсных частиц CoFe_2O_4 на сократительные реакции воздухоносных путей морских свинок / Л.В. Капилевич, Е.Ю. Дьякова, Л.М. Огородова [и др.] // **Кубанский научный медицинский вестник**. 2009. №1 (106). С. 48 – 51.

62. Оптические свойства аэрозоля раствора нанопорошка феррита кобальта / Т.Н. Зайцева, З.Р. Петлина, А.В. Носарев, Б.Г. Агеев, Л.В. Капилевич, Е.Ю. Дьякова [и др.] // **Бюллетень сибирской медицины**. 2009. №1. С. 101 – 102.

63. Исследование влияния селективных дезинтеграторов цитоскелета на сократительные реакции бронхов / Е.Ю. Дьякова, А.В. Носарев, Т.Н. Зайцева [и др.] // X конгресс молодых ученых и специалистов «Науки о человеке». Томск, 2009. С. 79 – 80.

64. Изменение сократительной активности гладких мышц при ингаляционном введении нанодисперсных частиц / Т.Н. Зайцева, Я.И. Моторыкина, А.В. Носарев, Е.Ю. Дьякова // X конгресс молодых ученых и специалистов «Науки о человеке». Томск, 2009. С. 81 – 83.

65. Исследование влияния взвеси нанодисперсных частиц CoFe_2O_4 на сократительные реакции воздухоносных путей животных при ингаляционном введении и при воздействии на изолированные сегменты / Л.В. Капилевич, Е.Ю. Дьякова, Т.Н. Зайцева [и др.] // **Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова**. 2009. №1. С. 74 – 78.

66. Влияние взвеси наноразмерного феррита кобальта на сократительные реакции гладких мышц воздухоносных путей / Т.Н. Зайцева, А.В. Носарев, Е.Ю. Дьякова [и др.] // Научная конференция с международным участием, посвященная 120-летию кафедры нормальной физиологии СибГМУ (ТМИ) и кафедры физиологии ТГУ «Нейрогуморальные механизмы регуляции висцеральных органов и систем в норме и при патологии». Томск, 2009. С.75 – 77.

67. Исследование влияния дезинтеграторов цитоскелета на сократительные реакции гладких мышц воздухоносных путей / Л.В. Капилевич, Т.Н. Зайцева, А.В. Носарев, Е.Ю. Дьякова // Научная конференция с международным участием, посвященная 120-летию кафедры нормальной физиологии СибГМУ (ТМИ) и кафедры физиологии ТГУ «Нейрогуморальные механизмы регуляции висцеральных органов и систем в норме и при патологии». Томск, 2009. С. 77 – 80.

68. Влияние нанодисперсных частиц феррита кобальта (CoFe_2O_4) на сократительные реакции воздухоносных путей морских свинок / Л.В. Капилевич, Е.Ю. Дьякова, А.В. Носарев [и др.] // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** 2010. Т. 141, №1. С. 77 – 80.

69. Зайцева Т.Н., Носарев А.В., Дьякова Е.Ю. Регуляция сократительной активности гладких мышц трахеи морских свинок при ингаляции наночастиц металлов // XI конгресс молодых ученых и специалистов «Науки о человеке». Томск, 2010. С. 53 – 54.

Тираж 100. Заказ № XXXX

Издательство «XXX»

тел. XXXXX

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX