

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ЗАЙЦЕВА ТАТЬЯНА НИКОЛАЕВНА

**СОКРАТИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЛАДКИХ МЫШЦ
ВОЗДУХОНОСНЫХ ПУТЕЙ В ПРИСУТСТВИИ НАНОРАЗМЕРНЫХ
ЧАСТИЦ**

03.03.01 – физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,

доцент **А. В. НОСАРЕВ**

ТОМСК – 2016

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БАВ – биологически активное вещество

ВП – воздухоносные пути

ГМ – гладкие мышцы

ГМК – гладкомышечная клетка

КЛЦМ – киназа легких цепей миозина

МН – механическое напряжение

Ca-КМ – кальций-кальмодулиновый комплекс

цАМФ – циклический 3:5-аденозинмонофосфат

цГМФ – циклический 3:5-гуанозинмонофосфат

NO – оксид азота

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ	2
СОДЕРЖАНИЕ	3
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Структурно-функциональная организация гладких мышц	11
1.2. Регуляция функционирования гладких мышц вторичными посредниками	15
1.3. Взаимодействие наноразмерных структур с биологическими объектами.....	19
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	32
2.1. Концентрационные характеристики аэрозолей, содержащих наноразмерные структуры	32
2.2. Сократительная активность гладких мышц воздухоносных путей.....	37
2.2.1. Объект исследования.....	37
2.2.2. Методы исследования.....	38
2.2.3. Метод механографии	39
2.2.4. Растворы и реактивы.....	41
2.2.5. Статистическая обработка результатов	41
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	43
3.1. Механическое напряжение гладких мышц воздухоносных путей в условиях ингаляционного введения наночастиц	43
3.1.1. Особенности холинергической регуляции сократительных реакций гладких мышц воздухоносных путей морских свинок при ингаляционном введении наночастиц феррита кобальта, магнетита и диоксида олова.....	43
3.1.2. Особенности гистаминергической регуляции сократительных реакций гладких мышц воздухоносных путей при ингаляционном введении наночастиц феррита кобальта, магнетита и диоксида олова	48

3.1.3. Особенности адренергической регуляции сократительной активности гладких мышц воздухоносных путей при ингаляционном введении наночастиц феррита кобальта, магнетита и диоксида олова	53
3.2. Механическое напряжение гладких мышц воздухоносных путей в условиях введения наночастиц <i>in vitro</i>	60
3.2.1. Особенности холинергической регуляции сократительных реакций гладких мышц воздухоносных путей морских свинок при действии наночастиц феррита кобальта, магнетита и диоксида олова <i>in vitro</i>	60
3.2.2. Особенности гистаминергической регуляции гладких мышц воздухоносных путей при действии наночастиц феррита кобальта, магнетита и диоксида олова <i>in vitro</i>	64
3.2.3. Особенности адренергической регуляции гладких мышц воздухоносных путей при взаимодействии с наноматериалом <i>in vitro</i>	67
3.3. Исследование роли эпителия воздухоносных путей на сократительные реакции гладких мышц в присутствии наноразмерных структур	72
3.3.1. Участие эпителия в холинергической регуляции сократительных реакций гладких мышц воздухоносных путей морских свинок	72
3.3.2. Участие эпителия в гистаминергической регуляции сократительных реакций гладких мышц воздухоносных путей	78
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	84
ВЫВОДЫ.....	87
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	89

ВВЕДЕНИЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Одной из актуальных проблем современной физиологии является изучение сократительных свойств гладких мышц (ГМ) внутренних органов. Несмотря на большой объем сведений, до сих пор малоизученными остаются механические свойства гладкомышечных клеток воздухоносных путей, механизмы локальной и дистантной регуляции сократительной активности, роль эпителия и клеток микроокружения. Определенный интерес представляет изучение сократительной активности гладких мышц воздухоносных путей, опосредованной действием физиологически активных веществ, а также в условиях формирования их дисфункций [3, 70].

В настоящее время среди множества возможных причин развития гиперреактивности воздухоносных путей не последнюю роль отводят ингаляционному воздействию наноразмерных материалов, поскольку инспираторный путь попадания наночастиц в организм представляется наиболее вероятным. В связи с этим, большое количество исследований сконцентрировано на возможных последствиях ингаляции наночастицами [35, 69].

СТЕПЕНЬ ПРОРАБОТАННОСТИ ТЕМЫ

Основные изменения, возникающие при действии наноматериалов на биообъект, широко представлены в литературе [64, 101, 125]. Используя инспираторный способ введения наноматериала, оценивают участие наночастиц в индуцировании воспаления, развития респираторных и сердечно-сосудистых заболеваний [128]. Воздействием наноразмерных частиц стимулируются выработка маркеров воспаления, формирование окислительного стресса, изменение свойств мембраны, а также нарушение функционирования ряда внутриклеточных структур, в частности элементов цитоскелета [33, 130, 140], что в комплексе и является причиной изменения метаболизма клеток воздухоносного тракта.

Внутриклеточный окислительный стресс считают одним из ключевых механизмов токсичности многих наноматериалов [88]. Одной из причин повышенного количества активных форм кислорода может являться непосредственное воздействие наночастиц на эпителий воздухоносных путей и эндотелий сосудов, что ведет к последующей активации NO-синтазы и накоплению пероксинитрита.

Одним из начальных этапов повреждения клеток, вызванного окислительным стрессом, является диссоциация белков цитоскелета [133]. Известно, что в сосудистых гладкомышечных клетках цитоскелет выполняет роль пространственного регулятора внутриклеточной сигнализации. Таким образом, реорганизацию цитоскелета можно рассматривать, как одну из причин изменения порядка сигнальных молекул, что, в свою очередь, опосредует изменения сократительной активности [142].

Кроме того, показано, что ингалированные наночастицы могут транспортироваться по эпителию воздухоносных путей и вызывать высвобождение воспалительных маркеров [43, 105]. Наноразмерные частицы при этом могут подвергаться эндоцитозу эпителиоцитами [40, 63].

Несмотря на широкий интерес к изучению наноматериалов, просматривается недостаточное понимание физических и химических процессов, а также биологических последствий взаимодействия наноструктур с биологическими объектами. Поэтому проведение дополнительных исследований будет способствовать уточнению механизмов действия наночастиц на сократительную функцию гладких мышц, а также дополнит существующие представления о роли ряда биологически активных веществ в обеспечении регуляции реактивности бронхов. Кроме этого, выяснение механизмов регуляции гладких мышц внутренних органов является одной из актуальных задач, рассматриваемых в биологии и медицине, решение которой обеспечит создание основы для разработки молекулярных подходов к коррекции их функционирования.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: Изучить сократительную активность гладких мышц воздухоносных путей морских свинок при воздействии наноразмерных частиц.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ:

1. Изучить гистаминергическую, холинергическую и адренергическую регуляцию механического напряжения гладких мышц воздухоносных путей морских свинок при ингаляционном введении наноразмерных частиц.

2. Исследовать гистаминергическую, холинергическую и адренергическую регуляцию механического напряжения гладких мышц воздухоносных путей морских свинок при воздействии наноразмерных частиц *in vitro*.

3. Определить влияние бронхиального эпителия на гистаминергические и холинергические сократительные ответы гладких мышц воздухоносных путей при действии наноразмерных частиц.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Впервые показано, что сократительные ответы гладких мышц на гистаминергические и холинергические воздействия усиливаются при ингаляционном поступлении наноразмерных частиц. При этом адренергическое расслабление зависит от предсокращающего фактора: реакция на сальбутамол усиливается на фоне предсокращения гистамином и угнетается в условиях предсокращения гиперкалиевым раствором Кребса. Выявленные изменения не зависят от химической природы наноразмерных частиц.

Впервые показана зависимость изменения сократительных ответов гладкомышечных сегментов воздухоносных путей на холин-, гистамин- и адренергические воздействия в присутствии взвеси наноразмерных частиц *in vitro* от химической природы этих частиц. При интактном эпителии феррит кобальта угнетает холинергические, а магнетит – гистаминергические сократительные реакции. При этом магнетит потенцирует адренергическое

расслабление на фоне предсокращения гиперкалиевым раствором Кребса в отсутствие эпителия.

Впервые исследовано изменение сократительных ответов гладкомышечных сегментов воздухоносных путей на гистаминергические и холинергические воздействия в условиях сохранного и удаленного эпителия. При обработке сегментов взвесью наноразмерных частиц *in vitro* влияние эпителия на величину сократительного ответа гладкомышечных клеток сохраняется, тогда как при ингаляционном поступлении наноразмерных частиц влияние эпителия на сократительные реакции снижается.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ

Результаты исследования являются вкладом в развитие фундаментальных знаний об адренергической, холинергической и гистаминергической регуляции функций гладких мышц воздухоносных путей. Полученные данные дополняют представления о сократительных реакциях гладкомышечных клеток воздухоносных путей в условиях воздействия наноразмерных частиц.

Результаты исследования могут оказаться перспективными для разработки комплексной оценки влияния наноматериалов на организм. Изучение характера изменений функционирования биообъектов при данном воздействии может послужить теоретической основой для разработки и модернизации технологий фармакологического внедрения наноразмерных материалов, профилактики и прогнозирования течения и исходов заболеваний легочной системы, возникающих в результате воздействия наночастиц.

Основные положения работы используются в курсах лекций и практических занятиях, проводимых на кафедре биофизики и функциональной диагностики Сибирского государственного медицинского университета, на кафедре медико-биологических дисциплин Томского государственного педагогического университета, в исследовательском процессе лаборатории атмосферной абсорбционной спектроскопии ИОА СО

РАН. Области применения полученных данных являются физиология, биофизика.

ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. Сократительные реакции гладких мышц воздухоносных путей на гистаминергическое и холинергическое воздействие усиливаются при ингаляционном поступлении наноразмерных частиц. Величина адренергического расслабления зависит от предсокращающего фактора: реакция на сальбутамол усиливается в условиях предсокращения гистамином и угнетается в условиях предсокращения гиперкалиевым раствором Кребса.

2. При введении наноразмерных частиц *in vitro* изменения сократительных реакций гладких мышц воздухоносных путей на гистамин-, холин- и адренергическое воздействие разнонаправлено и зависит от вида наноматериала и сохранности эпителия.

3. В присутствии эпителия воздухоносных путей происходит угнетение сократительных реакций гладкомышечных сегментов на гистаминергические и холинергические воздействия. Указанный эффект эпителия сохраняется при обработке сегментов взвесью наноразмерных частиц *in vitro*, но подавляется при их ингаляционном поступлении.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ

Основные результаты, представленные в диссертации, представлены на всероссийских и международных конгрессах: •XV рабочая группа "Аэрозоли Сибири" Томск, 2008г. ; •X конгресс с международным участием молодых ученых и специалистов "Науки о человеке" Томск, 2009г.; •Научная конференция с международным участием, посвященная 120-летию кафедры нормальной физиологии СибГМУ (ТМИ) и кафедры физиологии ТГУ Томск, 2009г.; •V Международная Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых, Москва, 2010 г.; •XI конгресс с международным участием молодых ученых и специалистов "Науки о человеке" Томск, 2010г.; • XXXVIII заочная научная конференция

International Research Journal, Екатеринбург, 2015г.; •Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы науки на современном этапе развития», Стерлитамак, 2015г.

Исследования поддержаны грантом РФФИ – «Разработка технологии контроля оценки повреждающего действия различных наноматериалов при ингаляционном поступлении» (№09-04-99124-р_офи).

По теме диссертации опубликовано 20 научных работ, в том числе 9 в журналах и изданиях, определенных ВАК РФ.

СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ

Диссертация изложена на 104 страницах машинописного текста. В структуре представлены главы: введение, обзор литературы, «Материалы и методы», собственные результаты и их обсуждение, заключение. Библиография состоит из 148 ссылок, из них 32 – работы отечественных авторов. Работа иллюстрирована 28 рисунками.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Структурно-функциональная организация гладких мышц

Поверхность легких – наибольшая площадь поверхности человеческого тела находящаяся в прямом контакте со средой, при этом барьер между воздухом и кровеносным руслом имеет малую величину. Гладкомышечные клетки (ГМК) в трахее представлены пучками миоцитов, расположенных слоями. В стенке главных бронхов мышечная ткань расположена так же, как и в трахее [23]. Размеры ГМК представленных в воздухоносных путях варьируют от 50 до 80 мкм [24]. Основной структурной единицей гладкой мышцы является гладкомышечная клетка. Гладкие миоциты являются одноядерными клетками преимущественно веретеновидной формы, не обладающие поперечной исчерченностью и образующие многочисленные соединения друг с другом. Длина клеток в состоянии расслабления варьирует в пределах 20-1000 мкм в зависимости от тканей, к которым принадлежат (составляя, в среднем, около 200 мкм), их толщина колеблется от 2 до 20 мкм. При резком сокращении длина ГМК может уменьшаться до 20% от первоначальной, наиболее крупные клетки характерны для стенки внутренних органов, самые мелкие (длиной около 20 мкм) располагаются в стенке сосудов. Гладкие миоциты окружены сарколеммой, которая снаружи покрыта базальной мембраной, клетки содержат одно ядро и саркоплазму, в которой располагаются органеллы и включения [2].

Сарколемма ГМК включает в себя плазматическую и базальную мембраны, при этом формируется значительное количество caveол. Гладкомышечные клетки образуют многочисленные электрические контакты типа нексусов [24]. Ключевые клетки, расположенные в ткани гладких мышц, имеют плотные соединения с нервными волокнами. Те клетки, которые не имеют непосредственной иннервации, получают потенциал от ключевых клеток за счет электротонической связи с ними, а также обеспечиваются

дистантным медиаторным влиянием. В соединительной ткани половозрелых животных, расположенной на периферии кластеров ГМК, находятся автономные нервные пучки [12].

Сократительный аппарат ГМК представлен миофибриллами, состоящими из актина и миозина, которые не имеют регулярного распределения. Упорядоченность актиновых филаментов ГМК обеспечивается при помощи их прикрепления к содержащим α -актинин электронно-плотным образованиям. Актин осуществляет регуляцию АТФ-азной активности миозина. Фосфорилирование миозина обеспечивает актин-зависимую активацию. Миозин гладких мышц имеет в своем составе легкие и тяжелые цепи. В результате фосфорилирования легких цепей, актин-зависимая активация АТФ-азной активности миозина возрастает. Степень сокращения ГМК напрямую соотносится с величиной фосфорилирования-дефосфорилирования легких цепей миозина [5, 21, 53]. Фосфорилирование легкой цепи осуществляется путем переноса киназой легких цепей миозина терминальной фосфатной группировки АТФ на сериновые и треониновые гидроксильные группы. Фосфатаза легких цепей миозина ГМК осуществляет дефосфорилирование [67, 68].

За счет трехмерной структуры цитоскелета поддерживается архитектура клеток [91, 112]. Микротрубочки у эукариот участвуют в таких процессах как клеточный транспорт, клеточная сигнализация, подвижность и митоз [81, 59]. Микрофиламенты, промежуточные волокна, микротрубочки являются полимерами, выстроенными из субъединиц глобулярных белков [6, 7] актина, тубулина и белков промежуточных филаментов, специфичных для разных видов тканей. Для всех элементов цитоскелета характерно то, что они представляют собой белковые фибриллярные полимеры, которые проявляют свою нестабильность в способности к полимеризации и деполимеризации [58]. Полимеризация мономеров и стабилизация элементов цитоскелета зависит от наличия белков-регуляторов [107]. Критичную роль в полимеризации тубулина отводят гуанозинтрифосфату и его сайту

связывания с тубулином. При сборке микротрубочек гуанозинтрифосфат гидролизуется до гуаназин-5-дифосфата [54]. При этом F-актин проявляет свойства АТФ-азы, поскольку при переходе молекулы G-актина в F-актин, происходит медленная гидролизация прочно связанной G-актином с молекулы АТФ до АДФ [92]. С G- и F-актином специфически взаимодействуют более 50 различных белков, находящихся в цитоплазме клеток. Известны два вида белков ассоциирующих с микротрубочками: белки-транслокаторы и структурные белки (белки, ассоциированные с тубулином).

Изменение динамики актиновых филаментов связано с сократительной активностью ГМК, обусловленной активацией рецепторов [122]. При этом, в сосудистых ГМК микротрубочки не оказывают значимого воздействия на изменение механических характеристик, но им отводят важную роль в кальций-зависимой сигнализации [114].

Вход Ca^{2+} в цитоплазму ГМК является ключевым механизмом передачи информации с деполяризованной мембраны к сократительным белкам. Увеличение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} обусловлено освобождением из внутриклеточных депо и поступлением из внеклеточной среды [119]. Количество ионов, содержащихся в гладких мышцах трахеи достаточно для реализации однократного сокращения [33]. В ГМК Ca^{2+} в виде комплекса Са-КМ активирует КЛЦМ.

В покое сарколема ГМК воздухоносных путей (ВП) преимущественно проницаема для ионов калия, при этом в формировании потенциала покоя так же принимают участие ионы натрия. Электрогенная компонента активного транспорта также вносит вклад в генерацию потенциала покоя [24].

Считается, что деполяризация мембраны обуславливает вход ионов Ca^{2+} по потенциал-зависимым кальциевым каналам, что и является основным механизмом электромеханического сопряжения возбуждения и сокращения

гладкомышечных клеток. Этот процесс модулируется большим количеством внутриклеточных сигнальных механизмов.

В мембране воздухоносных ГМК в основном потенциал-зависимые кальциевые каналы представляют каналы входящего тока [84].

В мембране ГМК воздухоносных путей более разнообразно представлены каналы выходящего тока. Помимо калиевых каналов задержанного выпрямления, обеспечивающих фазу реполяризации потенциала действия, присутствуют Ca^{2+} -зависимые калиевые каналы. Для их активации необходимо присутствие ионов кальция [20]. В респираторных ГМК, проницаемость этих каналов регулируется цГМФ-зависимыми протеинкиназами [34].

На мембране ГМК, в том числе и ГМК воздухоносных путей находятся многочисленные рецепторы к БАВ. Отмечают высокую плотность мускариновых M_3 -холинорецепторов, которые оказывают активирующее влияние на сократительную активность бронхов. Реализуется механизм бронхоконстрикторного эффекта посредством инициации рецепторуправляемого входа кальция в ГМК и последующей активацией фосфолипазы-С [1, 72]. Неодинаковая экспрессия подтипов мускариновых рецепторов отличается в различных отделах респираторного тракта.

Подобно этому реализуется и механизм гистаминергического воздействия на ГМК бронхов и также носит констрикторный характер [8]. В мембране ГМК воздухоносного тракта присутствуют H_1 - и H_2 -гистаминергические рецепторы [79]. Отмечают, что гистамин оказывает подобное влияние на бронхи как проксимальные, так и дистальные и человека и морских свинок [57]. При этом необходимо учитывать роль эпителия как одного из возможных механизмов расслабления бронхов [78]. В литературе представлены данные о расслаблении ГМК воздухоносных путей морских свинок опосредованных гистаминергическими H_1 -рецепторами.

Расслабляющее влияние на воздухоносные пути связывают с действием симпато-адреналовой системы. Преобладание β_2 -подтипа адренорецепторов у человека, свиньи, морской свинки, и β_1 -подтипа – у собак, кроликов, крыс, обуславливает видовые особенности регуляции тонуса бронхов [1, 8]. β -рецепторы посредством G_s -белка сопряжены с аденилатциклазой, и при её активации реализуется бронхорасслабляющее влияние катехоламинов. Кроме того, активация β -адренорецепторов ГМК воздухоносных путей влечет за собой перераспределение в цитозоле ионов Ca^{2+} [144]. При этом отмечено, что исходный тонус и вид вещества, применяемый для тонизирования *in vitro*, оказывают влияние на чувствительность ГМК воздухоносных путей к расслабляющему действию β -адреномиметиков [132].

1.2. Регуляция функционирования гладких мышц вторичными посредниками

Многочисленные физиологически активные соединения, биологически-активные вещества (БАВ) при взаимодействии со специфическими рецепторами мембраны, оказывает свое регулирующее влияние на клетки через систему вторичных посредников: циклический 3,5-аденозинмонофосфат (цАМФ), циклический 3,5-ганолинмоофосфат (цГМФ), ионы кальция (Ca^{2+}), продукты метаболизма мембранных фосфоинозитидов (ФИ) - диацилглицерол и инозитолтрифосфат, оксид азота, арахидоновая кислота [22, 33]

В обеспечении постоянства ионного гомеостаза гладких мышц воздухоносных путей, помимо ионных каналов задействованы также и системы активного транспорта. Сюда же относится АТФ-аза. Наиболее значимую физиологическую роль отводят для Na/K-АТФ-азы, Na/ Ca^{2+} обменника, Ca^{2+} -АТФ-азы сарколеммы и кальциевых депо [94]. Ca^{2+} -АТФ-аза ГМК является электронейтральной, ее активность регулируется посредством участия Ca^{2+} и цАМФ [14]. Влиянию мембранного потенциала так же не

подвержен Na/Ca^{2+} обменник ГМК бронхов, регуляция осуществляется при участии внутриклеточных мессенджеров [16]. Одна из центральных ролей в регуляции сопряжения возбуждения-сокращения ГМК отводится ионам кальция. Одним из условий осуществления сигнальной функции ионов кальция является поддержание исходно низкой цитоплазматической концентрации этих ионов. Контроль концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме обеспечиваются системой ионных каналов плазматической мембраны, внутриклеточными кальций-освобождающими механизмами, Ca^{2+} транспортирующими системами [33]. Активация мембранных рецепторов при взаимодействии БАВ с рецепторами мембраны вызывает открывание Ca^{2+} -каналов [37]. В число агентов, способных активировать рецептор-управляемые Ca^{2+} -каналы входят агонисты α_1 -адрено-, M_3 -холино-, H_1 -гистаминергических и некоторых других рецепторов. По кинетике активации и инактивации выделяют два типа потенциал-зависимых кальциевых каналов – медленные неинактивирующиеся и быстрые инактивирующиеся кальциевые каналы, их отличия заключаются в механизмах регуляции, а также в параметрах активации/инактивации. О взаимодействии хемозависимых и потенциалзависимых путях активации кальциевых каналов нет единого мнения. Существуют различные гипотезы о синергизме, антагонизме, полной независимости и в характере их функционировании [29, 30, 31]. Нельзя исключить наличие в мембране ГМК особого вида кальциевых каналов, для которых характерно одновременная потенциалзависимость и хемозависимость. Действие Ca^{2+} -КМ-зависимых протеинкиназ обуславливает многочисленные эффекты активации Ca^{2+} -зависимой сигнальной системы. Субстратом Ca^{2+} -КМ-зависимых протеинкиназ, являются в том числе и киназы легких цепей миозина [11]. Активация Ca^{2+} -зависимой K^+ -проводимости, стимуляция фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов, инактивация потенциалзависимого входа кальция – также являются важными эффектами ионов Ca^{2+} в ГМК воздухоносных путей [21, 77]. Многочисленные и разнообразные внутриклеточные эффекты Ca^{2+}

реализуются посредством системы Ca^{2+} -кальмодулин [15, 19]. Для нее характерна способна одновременно регулировать такие механизмы, как поступление ионов кальция в клетку, а так же депонирование их в саркоплазматическом ретикулуме или выведение во внеклеточную среду [19]. Учитывая многочисленное участие ионов кальция в качестве регулятора внутриклеточного метаболизма, можно считать, что кальмодулин занимает одно из ведущих мест в процессах сопряжения возбуждения-сокращения ГМК. При действии возбуждающих агентов концентрация свободных ионов кальция в клетке увеличивается и достигает 10мкМ . Процесс взаимодействия иона кальция с кальмодулином, ведет к конформационным изменениям молекулы и переводит комплекс Са-КМ в активное состояние. Взаимодействие комплекса с КЛЦМ переводит фермент в активную форму. Активная КЛЦМ фосфорилирует легкие цепи миозина и становится возможной активация актином АТФ-азы миозина [33].

Активация посредством действия форсколином аденилатциклазы (АЦ), введение в клетку или цАМФ, или каталитической субъединицы протеинкиназы-А, либо снижение активности фосфодиэстеразы, влекут за собой гиперполяризацию мембраны и понижение механического напряжения [66]. В ГМК основные пути реализации цАМФ-зависимой сигнальной системы реализуются посредством двух основных путей. Первый путь обуславливает снижение сократительной активности, вследствие цАМФ-зависимого фосфорилирования киназы легких цепей миозина. С другой стороны, происходит цАМФ-зависимая активация калиевой проводимости плазмалеммы и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмена [25]. При этом развивается гиперполяризация мембраны, снижается потенциалзависимый вход ионов Ca^{2+} и, в результате снижается сократительная активность ГМК.

Удаление ионов Ca^{2+} в эндоплазматический ретикулум, во внеклеточную среду, митохондрии, ограничение поступления ионов в клетку и регуляция фосфоинозитидного цикла активируется цГМФ-зависимыми

протеинкиназами [22]. В частности, цГМФ-зависимая протеинкиназа активирует Ca^{2+} -зависимые K^{+} -каналы в ГМК воздухоносных путей [34].

Диацилглицерол активирует протеинкиназу-С в присутствии Ca^{2+} и фосфатидилсерина [3]. Данные относительно эффектов протеинкиназы-С в ГМК воздухоносных путей противоречивы. Так, в сократительных реакциях ГМК трахеи морских свинок принимает участие протеинкиназа-С (в ответ на серотонин, гистамин, гиперкалиевый раствор), но не ацетилхолин [55].

Известно, что увеличение уровня ионов Ca^{2+} ведет к активации NO-синтазы. При действии NO происходит активация растворимой гуанилатциклазы и повышение уровня цГМФ. Считают, что возможна индукция цитокинами синтазы оксида азота в легких людей страдающих бронхиальной астмой [2]. Существуют подтверждения того, что путь NO/цГМФ участвует в регуляции реактивности ГМК бронхов. Развитие гиперреактивности к гистамину в изолированной трахее морских свинок может быть связано с понижением активности гуанилатциклазы [120].

У человека с действием NO связывают, расширение бронхов без участия адренергических или холинергических рецепторов, блокирование бронхоспазма вызываемого гистамином. Продуцентами NO в дыхательных путях являются эндотелиальные клетки, сенсорные нервные волокна, клетки эпителия и клетки участвующие в воспалительных реакциях, и экспрессирующие NO-синтазы конститутивную и/или индуцируемую, при этом разные цитокины могут участвовать в индукции фермента. У морских свинок низкими дозами L-аргинина может быть устранена гиперреактивность бронхов вирусной и аллергической этиологии, обусловленной недостаточностью конститутивной NO-синтазы [104].

Метаболитам арахидоновой кислоты принадлежит важная роль в регуляции тонуса ГМК воздухоносных путей. Для трахеи морской свинки и для бронхов человека возможными медиаторами тонуса в покое являются сократительные простаноиды и пептидные лейкотриены, в том числе и C4 и E4 [90].

Эпителий воздухоносных путей вырабатывает различные факторы, которые могут также влиять на сократительную активность ГМК воздухоносных путей. Установлено, что эпителиальные клетки дыхательных путей продуцируют биологически-активные вещества, такие как эйкозаноиды, цитокины, кислородные радикалы и следовательно, могут рассматриваться как эффективные паракринные железы [52]. На роль релаксирующего фактора, выработанного эпителием, претендуют оксид азота и/или продукты липоксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты [127]. Так называемые клетки Кульчитского относятся к специализированным клеточным элементам трахеобронхиального эпителия и претендуют на роль регуляторов тонуса ГМК. Вследствие механического удаления эпителия увеличивается реактивность ГМК воздухоносных путей на действие гистамина, карбахолина, серотонина и электростимуляцию [93, 108].

1.3. Взаимодействие наноразмерных структур с биологическими объектами

Под наноматериалами принято понимать материалы, основные структурные элементы (кристаллиты, волокна, слои, поры) которых не превышают так называемой технологической границы 100нм, по крайней мере в одном направлении. Считается, что при снижении размеров частиц до того состояния, когда соотношение числа поверхностных атомов к общему объему атомов в частице стремится к 0,5, возникают значительные различия в основных физических характеристиках материала [4].

В основном, современные методы получения наночастиц магнитных материалов, условно можно разделить на две группы – основанные на получении наночастиц из компактных материалов или же, в противоположность, основанные на сборке из атомов, ионов, молекул наночастиц. В сравнении с методами получения магнитных наночастиц по принципу измельчения (испарение-конденсация, лазерная абляция,

дробление компактных материалов в шаровых мельницах), концепция сборки «снизу» располагает большим числом возможностей для контроля над размерами, формой, составом, структурой, процессами самоорганизации и физическими свойствами наночастиц. Удобным инструментом воплощения такого подхода являются методы химического синтеза наночастиц [27].

Кроме ставшего традиционным катализа, для наночастиц перспективно использование их в материалах для записи информации со сверхвысокой плотностью, для решения различных медицинских задач, например, в качестве переносчиков лекарств, создания сверхмощных магнитов, различных сенсоров, включая биомолекулярные, элементов “спиновой” электроники.

Прежде всего, риск развития негативных последствий при взаимодействии наноразмерных материалов с биологическим организмом стоит в противовес с заманчивыми возможностями их потенциального практического применения, что и обуславливает значительное увеличение количества экспериментальных исследований наночастиц в последнее время.

В настоящее время широко используются два вида биомедицинских применений магнитных наночастиц: использование их в качестве контрастных агентов в магнито-резонансной томографии (МРТ) для усиления контраста клеток специфического типа и для возбуждения контролируемых тепловых эффектов в заданных областях (гипертермия).

В качестве контрастного агента для МРТ, магнито-резонансной лимфографии используются наночастицы магнетита Fe_3O_4 [42, 96], бислойные наночастицы $Fe@Fe_3O_4$ [116] и $Fe_3O_4@SiO_2$ [109, 145].

Разрабатываются подходы к гипертермии опухолей на основе наночастиц [49, 124, 129]. Гипертермия включает процесс эндоцитоза клетками наночастиц и дальнейший лизис клеток опухоли при локальном перегреве.

В гипертермии применяют кроме чистого магнетита, также наночастицы магнетита допированные ионами гадолиния, а также феррита

кобальта – CoFe_2O_4 [60, 82, 124]. При этом достигается увеличение в скорости специфического поглощения энергии, а следовательно КПД процесса в целом.

Находят способы использования магнитных наночастиц для выделения, обнаружения, модификации и иммобилизации клеток и клеточных органелл, биологически активных соединений.

Так, использование биофункциональных наночастиц на основе Fe_2O_3 и CoFe_2O_3 , сопряженных с IgG, имеющим сайты связывания с клеточными рецепторами на поверхности бактериальных клеток, позволяет обнаруживать широкий спектр патогенов (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *E. gall*, *Streptococcus pneumoniae*, *E. coli* и др.) [65, 146].

Среди других применений магнитных наночастиц особый интерес представляет собой направленный перенос лекарств и генов [50].

Связывание наночастиц с ферментами приводит к сохранению их активности при отклонении таких параметров реакции как pH, температура от оптимальных [76]. Следовательно, использование наночастиц открывает перспективу модуляции каталитических свойств ферментов.

Многие исследования последствий взаимодействия наночастиц с биообъектом проводят, используя ингаляционный способ введения наноматериала. Этот выбор обусловлен тем, что воздухоносные пути представляют возможность поступления наноразмерных веществ при непосредственном и непроизвольном контакте.

Все больший круг исследователей указывает на возможность отрицательного воздействия наночастиц на живые организмы. В частности, при ингаляции углеродных нанотрубок лабораторным животным, отмечают возникающие вследствие этого воздействия респираторные проблемы [139]. Зафиксированы случаи смерти лабораторных крыс при вдыхании наночастиц [106].

Параметрами, определяющими негативное влияние наночастиц на здоровье, является их способность проникать в альвеолярные участки легких, вызывая механические, токсические, иммунологические повреждения.

После ингаляции воздушно-капельные частицы осаждаются на поверхностных структурах дыхательных путей. В альвеолах поверхностно-активное вещество вытесняет наночастицы к нижнему слою, вызывая тем самым их тесный контакт с эпителиоцитами. Так как плазматическая мембрана эпителиоцитов – первая структура, с которой сталкиваются частицы, необходимо понять, вызывают ли эти частицы изменения в плазматической мембране и как они поглощаются клетками. Одним из первых барьеров при попадании наночастиц в воздухоносный тракт является эпителий воздухоносных путей. При введении ультрамалых частиц наблюдали значительное увеличение поверхности плазматической мембраны эпителиоцитов. Увеличение апикальной плазматической мембраны было отражено подобными микроворсинкам клеточными поверхностными вытяжениями. При этом не происходило изменения экспрессии мРНК главных генов, требуемых для синтеза липидов, предположили, что увеличение липидов происходит за счет внутриклеточного мембранного депо, а не от нового синтеза. Таким образом, увеличение площади мембраны предохраняет эпителиоциты от повреждения и помогает запечатывать повреждения. Предположили, что механический стимул (напряжение) приводит к перемещению липидов к мембране, чтобы компенсировать увеличение поверхностного натяжения [99], потерю объема мембраны, возникшую при фагоцитозе [74] или повреждении [135]. Апикальная плазматическая мембрана альвеолярных эпителиоцитов выполняет многие функции, включая секрецию и поглощение компонентов сурфактанта клетками II типа, регуляцию жидкости клетками I типа. Любые изменения количественной композиции мембраны легочных эпителиоцитов, могут влиять на нормальный метаболизм этих клеток [43].

Изучения поглощения наночастиц биологическими системами позволяют считать, что одновременная агломерация, осаждение и диффузия в физиологических концентрациях могут обуславливать негативное влияние наноматериала на здоровье человека. Обследования пациентов, контактировавших с наноматериалами на рабочем месте, показали изменения легочной ткани, неспецифическое воспаление легких, легочный фиброз и гранулемы плевры. Наночастицы были найдены в цитоплазме и кариоплазме легочных эпителиальных клеток, а также находились в плевральном выпоте [126].

Экспериментальные исследования выявили много свидетельств того, что ингалированные наночастицы могут перемещаться по эпителию воздушного пространства и вызывать увеличение воспаления. Например, мембранные рецепторы на макрофагах и эпителиоцитах, опосредуют поглощение материальной точки и клеточную реакцию, такую как высвобождение воспалительных маркеров. Однако мало известно о влиянии размера частиц или материала на характеристики транслокации, воспалительной реакции и их внутриклеточной локализации [118].

Используя инспираторный способ введения наноматериала, Stone с соавторами оценили участие наночастиц в индуцировании оксидативного стресса, воспаления, развития респираторных и сердечно-сосудистых заболеваний. Показали более высокий уровень токсичности ультрамалых частиц по сравнению с малыми [128]. Результаты исследований на крысах демонстрируют, что наночастицы являются более токсичными, чем малоразмерные частицы подобного химического состава [138].

На примере частиц окиси церия показана более значимая роль их размера в развитии негативных последствий, в то время как количество или суммарная площадь поверхности частиц оказывают незначительное значение. Это может быть связано с быстрым формированием агломератов в жидкости и сбором малых частиц в агломераты большой плотности, содержащими большое количество частиц, в то время как большие частицы

остаются главным образом неагломерированными. Диффузия (фракция размера 25-50нм) или осаждение (фракция размера 250-500нм) ограничивают перенос наночастиц к фибробластам. При низких концентрациях частиц биологические процессы поглощения на поверхности клетки происходят быстрее, чем физический перенос к клеткам [95].

С другой стороны анализ данных показал фактически идентичную воспалительную реакцию на наночастицы TiO_2 различного размера. Уровень воспалительной реакции на углеродистые частицы зависел от массы и становился более выраженным, если площадь поверхности введенных частиц превышала "порог" (приблизительно 20см^2) [141].

Гистопатологические анализы тканей легкого показали, что воздействие на легкие крыс частиц кварца производили дозозависимые легочные воспалительные реакции. Warheit с соавторами предположили, что большая вероятность неблагоприятных легочных эффектов возникает при долговременном непрерывном воздействии и не зависит от размера и площади поверхности наночастиц [138].

Bermudez объясняет различия легочной реакции на введение наноматериала видовой принадлежностью грызунов, используемых для эксперимента. Прогрессивные эпителиальные и фиброзно-пролиферативные изменения наблюдались у крыс. Эти поражения состояли из очагов альвеолярной эпителиальной пролиферации, из метапластических эпителиоцитов, ограниченных и соединенных очагов, макрофагов сильно загруженных частицами. Наблюдаемые эпителиальные пролиферативные изменения также проявились у крыс в виде увеличения в альвеолах эпителиоцитов в стадии пролиферации клеток. С этими очагами эпителиальной пролиферации было связано внутритканевое накопление частиц и альвеолярный фиброз. Эти поражения стали более явными с течением времени. У мышей и хомяков эпителиальные, метапластические, и фиброзно-пролиферативные изменения не были замечены [38].

Ингаляционное воздействие наночастиц оксида железа размерами 22 и 280 нм на крыс линии Sprague Dawley в дозах 0,8 и 20 мг/кг вызывало индукцию активных форм кислорода в клетках, гиперемии, гиперплазии и фиброз тканей легких. Также было выявлено нарушение системы свертывания крови [147].

При введении крысам TiO_2 ингаляционным способом, обнаружили, что частицы размером 20 нм накапливались в лимфоидных тканях и обладали повреждающим воздействием в отношении к ДНК лимфоцитов и клеток мозга. Определили, что данный эффект обуславливался иницированием реактивных форм кислорода, возникновением окислительного стресса и накоплением малонового диальдегида. Наночастицы после попадания в альвеолярную часть легких проникают в системный круг кровообращения и, далее, в мозг, что может вызвать негативное воздействие на центральную нервную систему [61].

С другой стороны, после ингаляций наночастиц сажи наблюдалось их присутствие в легочных макрофагах, был повышен уровень циркулирующих воспалительных маркеров, в том числе интерлейкина-6 и С-реактивного белка. При этом электронно-микроскопическое исследование не обнаружило наноматериала в других тканях, включая печень, селезенку и аорту. Авторы предположили, что вдыхание наноразмерных частиц сажи образуют скопления в легких и не оказывают прямого негативного воздействия на внелегочные ткани. Сердечно-сосудистые изменения, опосредованные ингаляцией наночастиц, представляются индуцированными воспалительной реакцией возникающей при накоплении агрегированных наноразмерных частиц в легких [105].

Cheng с соавторами показал, что изменение свойств материалов происходит при их взаимодействии с биологическими объектами. Для однокомпонентных наночастиц нашли, что частицы меди оказывали более значимое влияние на продукцию интерлейкина-8. При подкислении наночастиц никеля серной кислотой, обнаружили, что в присутствии таких

двоично-составляющих наночастиц продукция интерлейкина-8 была увеличена в шесть раз. Так как никель переходный металл, он мог образовать свободные радикалы на поверхности клетки, кислотность, возможно, усилила оксидантный стресс, вызванный радикалами, приводя к увеличенной продукции интерлейкина-8. Этот результат показал сложность биологических реакций на действие наночастиц [51].

Многие исследования доказывают, что наночастицы могут поступать во многие типы клеток, даже те, у которых нет фагоцитарных рецепторов на поверхности и они не обладают фагоцитарной активностью. Для некоторых наночастиц мембрана клетки не обладает барьерной функцией. Механизмы поступления в клетку в настоящее время обсуждаются. Некоторые предполагают, что частицы поступают в клетки способом эндоцитоза, другие предлагают механизмы, отличные от эндоцитоза такие как диффузия, мембранная текучесть, проход через каналы или даже адгезивными взаимодействиями такими как электростатические взаимодействия, Ван-дер-Ваальсовы или стерические взаимодействия [118].

Park и Lu предполагают, что наночастицы поступают в клетки путем адгезии или диффузии, которые ставят под угрозу целостность мембраны. Показано, что большие дендримеры завершённые терминальным амином, у которого есть положительные заряды, вызывают формирование «дырки» в мембране. Вытесненные мембранные молекулы включают частицу и формируют дендример-заполненный мембранный пузырек. Завершённый ацетамидом дендример, у которого есть нейтральный заряд не вызывает формирование «дырки» [113].

Предполагают, что активность полимера должна снижаться, если пространство между реактивными аминогруппами увеличивается. Расположение катионных зарядов зависит от трехмерной структуры и гибкости макромолекул и предопределяет доступность этих зарядов на поверхности клетки. Разветвленные молекулы более эффективно нейтрализуют заряды клеточной поверхности, чем полимеры с линейной или

глобулярной структурой, вследствие более легкого прикрепления гибких молекул [123].

Таким образом, заряды, переносимые частицами, контактируя с клеточной мембраной, способствуют изменению биодоступности.

Зависимость цитотоксичности от заряда исследовали *in vitro* на экспериментальных организмах – *E.coli*. Диоксид олова SnO_2 (катионный заряд 4+) показал незначительный уровень цитотоксичности. Магнетит Fe_2O_3 (катионный заряд 3+) продемонстрировал умеренную цитотоксичность на *E. coli*. Определили, что цитотоксичность коррелировала с катионными зарядами – чем выше катионный заряд, тем ниже цитотоксичность наноразмерного металлического оксида [143].

Установлено, что наночастицы способны проникать не только через клеточные мембраны, но и через мембраны клеточных органелл. Наночастицы TiO_2 были обнаружены, как мембраносвязанные слои агрегатов или отдельные частицы, так же они проявили способность поступать не только в клетки, но также в митохондрии и ядро.

Среди всех возможных последствий ингаляционного поступления наночастиц в организм выделяют такие основные, как изменение легочной ткани, возникающие вследствие переноса наноматериала с током крови изменения других органов, а так же изменение уровня активных форм кислорода, маркеров воспаления и т.д. Поскольку изменения происходят как на тканевом, так и на клеточном уровнях, проводят соответствующее изучение изменений и поиск механизмов повреждающего действия.

Ряд авторов предполагает, что в клетке наночастицы нарушают баланс между процессами окисления, что может вызвать внутриклеточный окислительный стресс. Данный процесс считают одним из ключевых механизмов токсичности многих наноматериалов. С одной стороны, окислительный стресс, вызванный воздействием наночастиц, может стимулировать увеличение цитозольной концентрации кальция [44] или вызвать транслокацию факторов транскрипции, которые регулируют

провоспалительные факторы, такие как фактор некроза опухоли- α и индуцибельную NO-синтазу [48].

Исследования, проведенные в условиях *in vitro* с использованием различных клеточных систем, показали развитие у клеток, экспонированных к наночастицам, провоспалительных и связанных с окислительным стрессом реакций [32]. Окислительный стресс, вызванный активной поверхностью наночастиц, приводит к увеличению внутриклеточного кальция и к активации отдельных генов. Проникшие в клетку частицы металла приводят клетку к окислительному стрессу, увеличивая, в свою очередь, внутриклеточное содержание кальция и активируя отдельные гены. Клеточный рецептор, активированный металлом, высвободившимся из наночастицы, приводит к активации отдельных генов. EGFR (epidermal growth factor receptor) — рецептор эпидермального фактора роста. NF- κ B (ядерный фактор κ B) — основной транскрипционный активатор воспалительных цитокинов [56].

Наночастицы могут проявлять провоспалительные эффекты и вызывать апоптоз клетки через ROS-опосредованный механизм [44, 136] с другой стороны, повышение окислительного стресса может также изменить липиды и нуклеиновые кислоты, что в дальнейшем стимулирует антиоксидантную систему защиты или даже приводит к смерти клетки [115].

Таким образом, магнитные наночастицы широко распространены в природе и встречаются во многих биологических объектах. Наноразмерные вещества являются побочным продуктом человеческой деятельности и целевым в нанотехнологиях. Уже сейчас разработаны многочисленные потенциальные области применения наноматериалов в медицине и фармацевтической отрасли. Однако к настоящему времени многие исследователи отмечают недостаточность знаний о механизмах и направленности изменений функционирования систем биообъекта в присутствии наночастиц.

Большинство работ по изучению возможной токсичности наноразмерных материалов сконцентрировано на возможных последствиях ингаляции наночастиц [128, 138, 147 и др.]. Это обусловлено тем, что поверхность легких - наибольшая площадь поверхности человеческого тела находящаяся в прямом контакте со средой, при этом барьер между воздухом и кровеносным руслом имеет малую величину. Результаты проводимых исследований показывают сложность биологических реакций на действие наноструктур [61, 147]. Предполагают, что негативные последствия для организма могут возникать при непосредственном влиянии наноматериалов на ткани биообъекта, либо являются реакцией опосредованной изменением состояния или функционирования органов и систем.

Так как плазматическая мембрана эпителиоцитов – первая структура с которой сталкиваются частицы, основным интерес возникает при изучении механизмов взаимодействия наноразмерных частиц с клеточной мембраной, возможных путей их проникновения и мест внутриклеточной локализации [43]. Экспериментальные изучения находят много свидетельств того, что ингалированные наночастицы могут перемещаться по эпителию воздушного пространства и вызывать увеличение воспаления и высвобождение воспалительных маркеров [43, 105]. Несколько изучений показали, что частицы различных размеров могут быть подвергнуты эндоцитозу эпителиоцитами [40, 63]. Показано, что наночастицы могут использовать актиновые структуры в пределах филоподий и структур, подобных микроворсинкам, для обеспечения их продвижения в альвеолярных эпителиоцитах II типа. Этот путь зависит от поверхностного заряда материальной точки и от целостности волокон актина, объясняя связь частицы с внутриклеточной средой через мембрану клетки [111].

На клетках линии A549 (клетки легочного эпителия человека) показали способность ультрамалых частиц вызывать увеличение поверхности плазматической мембраны [43]. С другой стороны, предполагают, что наночастицы поступают в клетки путем адгезии или диффузии, которые

ставят под угрозу целостность мембраны [113]. Показано, что большие дендримеры, завершённые терминальным амином, у которого есть положительные заряды, вызывают формирование «дырки» в мембране. При этом, изменения, встречающиеся в количественной композиции мембраны легочных эпителиоцитов, могут оказывать влияние на нормальный метаболизм этих клеток [43]. В дыхательных путях клетки эпителия относят к продуцентам оксида азота (NO). В частности у человека блокирование бронхоспазма, вызываемого гистамином, расширение бронхов без участия адренергических /холинергических рецепторов связано с NO. Так у морских свинок гиперреактивность воздухоносных путей вирусной и аллергической этиологии взаимосвязана с недостаточностью конститутивной NO-синтазы [104].

Среди других возможных механизмов повреждающего действия наночастиц на уровне клеток часто рассматривают их взаимодействие с элементами цитоскелета [64, 125]. На примере сосудистых гладкомышечных клеток показано, что цитоскелет является как пространственным регулятором внутриклеточной сигнализации, а изменение структуры цитоскелета может способствовать изменению порядка работы сигнальных молекул, что, в свою очередь, опосредует изменения сократительной активности [142]. Диссоциацию белков цитоскелета рассматривают как начальный этап повреждения клеток, обусловленного окислительным стрессом [133].

Кроме того, наноструктуры могут взаимодействовать с эндоплазматическими белками, такими как микротрубочки цитоскелета. Было показано, что торможение полимеризации тубулина зависело от концентрации наноматериала. Частицы TiO₂ оказывают ингибирующее действие на полимеризацию тубулина. Они взаимодействуют и с тубулином и с белками микротрубочек. Гуанозинтрифосфат связывающий сайт тубулина также повреждается наноразмерным TiO₂, приводя к изменениям функции тубулина [64].

Soenen с соавторами также показали способность наночастиц изменять структуру цитоскелета. Наноразмерные частицы оксида железа уменьшали клеточную пролиферацию, повреждали актиновый элемент цитоскелета и архитектуру сети микротубул, нарушая фокальную адгезию и созревание. При этом нарушалась экспрессия FAK-киназы – киназы фокальной адгезии (от focal adhesion kinase) и изменялось количество активизированной киназы (pY397-FAK). Авторы показали, что высокие уровни перинуклеарно локализованных наночастиц окиси железа уменьшают эффективность белковой экспрессии и препятствуют созреванию волокон актина, и, таким образом, могут оказывать негативное влияния на миграцию и дифференцирование клетки [125].

При действии силиконовых наночастиц на эпителиальные клетки линии C10 установили, что трансмембранный протеогликан синдекан-1 опосредует взаимодействие частиц с клеточной поверхностью, их связь с волокнами актина и последующую интернализацию посредством макропиноцитоза [110].

Поскольку изменение реактивности и нарушение тонуса бронхов является конечным патогенетическим звеном многих бронхолегочных заболеваний, интересным представляется исследование, направленное на изучение сократительной активности гладких мышц воздухоносных путей при действии биологически активных веществ в присутствии наноразмерных частиц.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Концентрационные характеристики аэрозолей, содержащих наноразмерные структуры

Для проведения ингаляций животных аэрозолями, содержащими нанопорошки, предварительно определялись параметры режима ингаляции – концентрации исходных растворов наночастиц, режим работы генератора аэрозоля, в качестве которого использовался ультразвуковой небулайзер «Муссон-1М» (Россия). Эффективность генерации аэрозольных частиц на выходе генератора определялась по пропусканию воздушно-аэрозольным слоем лазерного излучения длиной волны 0,63 мкм. Выполнили измерения пропускания воздушно-аэрозольными смесями по стандартной спектрофотометрической схеме на стенде ИОА СО РАН.

Для получения аэрозолей наноразмерных структур приготавливали водные растворы наноразмерных феррита кобальта (CoFe_2O_4), магнетита (Fe_3O_4) и диоксида олова (SnO_2) в концентрациях 0,1 мг/мл – 10 мг/мл. Полученные растворы подвергали обработке ультразвуком (model XL 2005, New York). Критерием считалось пропускание аэрозоля из дистиллированной воды, используемой для приготовления растворов наночастиц.

Измерения пропускания воздушно-аэрозольными смесями лазерного излучения выполнены по стандартной спектрофотометрической схеме, вид которой показан на рис. 1 и рис. 2.

Характеристика лазерного источника

В качестве источника лазерного излучения использовали серийный He-Ne лазер ЛГ-78. Длина волны 0,63 мкм, мощность $2 \cdot 10^{-3}$ Вт. Излучение лазера модулировалось по амплитуде с частотой 91 Гц при скважности 2.

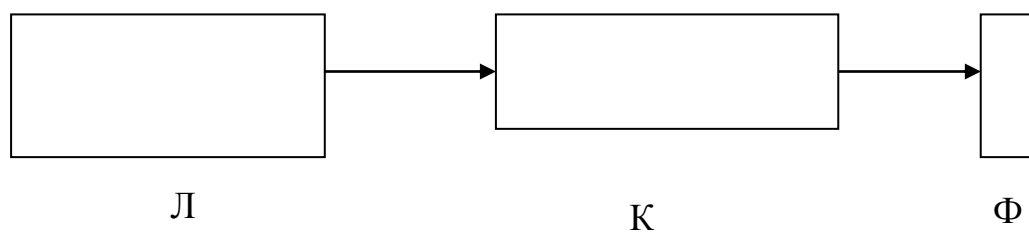


Рисунок 1. Схема регистрации

Л – лазер,

К – измерительная кювета,

Ф – фотоприемник,

Стрелками указано направление лазерного излучения.

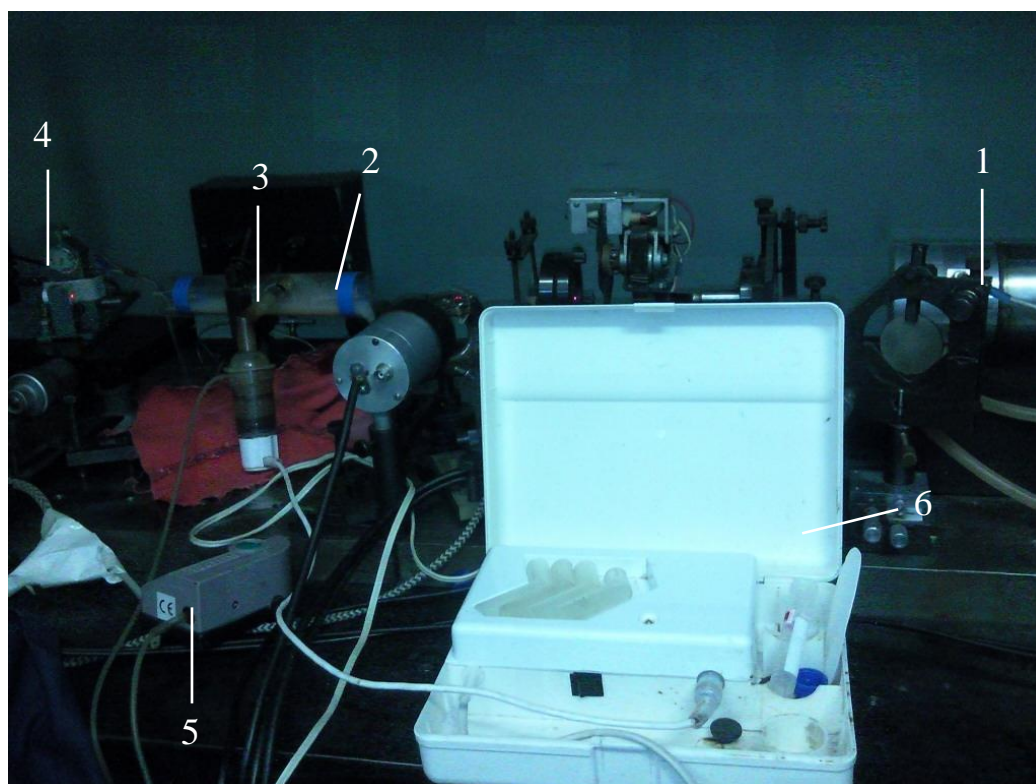


Рисунок 2. Схема регистрации

1 – лазер,

2 – измерительная кювета,

3 – выходной патрубок генератора аэрозоля,

4 – фотоприемник,

5 – воздушный компрессор,

6 – генератор аэрозоля.

Характеристика измерительной кюветы

Для создания воздушно-аэрозольного слоя использовали трубку из лавсана (диаметр 40 мм, длина 200 мм) с открытыми концами, в отверстие боковой стенки которой вставляли выходной патрубком генератора аэрозоля. Аэрозоль получали при помощи ультразвукового ингалятора «Муссон-1М» (производство: Россия, г. Барнаул, ОАО Алтайский приборостроительный завод «Ротор», размер частиц 5 мкм). Генератор имеет три режима работы (по мощности потока – 1, 2, 3 л/мин), позволяющих ступенчато изменять концентрацию аэрозольных частиц. При этом дополнительный поток создавался применением воздушного компрессора «ELITE-801» (скорость потока 1300 мл/мин, Malaysia), подключенного к ингалятору.

Характеристика фотоприемников

Применяли фотодиоды серии ФД, предназначенные для регистрации модулированного излучения в диапазоне длин волн от 0,4 до 1,1 мкм, чувствительность $\sim 5 \cdot 10^{-3}$ мА/лм.

Коэффициент пропускания слоя исследуемой среды определяли по формуле

$$T=U/U_0$$

где U – сигнал фотоприемника на выходе из кюветы, заполненной аэрозолем, U_0 – сигнал фотоприемника на выходе из кюветы без исследуемой среды.

При изучении пропускания излучения аэрозолем, полученным из дистиллированной воды без добавления наноматериала было установлено, что значения величины пропускания аппроксимируются экспонентой, что свидетельствует об ослаблении излучения по закону Бугера. Пропускание излучения аэрозолями, содержащими наночастицы мало отличалось от водного аэрозоля при высокой мощности работы небулайзера. На основании

этого сделали вывод, что, наиболее эффективным является получение аэрозоля при низкой мощности работы генератора ультразвука (рис. 3). При этом мощности ультразвукового распылителя было недостаточно для попадания аэрозольных частиц в измерительную кювету, поэтому дополнительный поток создавался применением воздушного компрессора (1300 мл/мин), подключенного к распылителю.

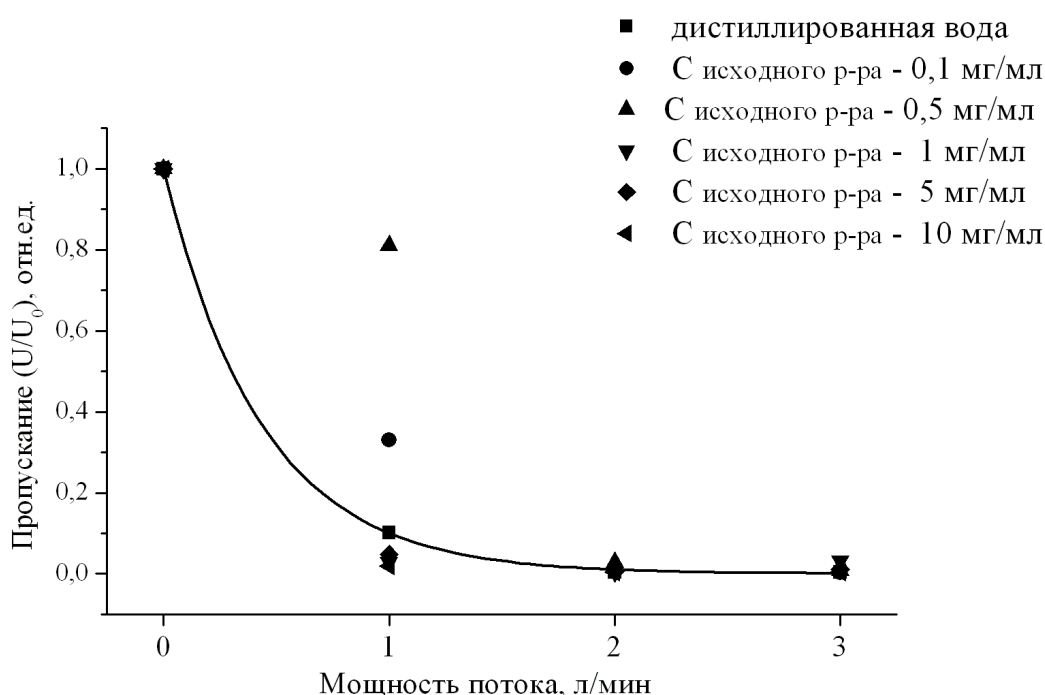


Рисунок 3. Поглощение лазерного излучения (0,63 мкм) воздушно-аэрозольной смесью при вариации мощности потока аэрозоля и концентрации аэрозольных частиц в исходном растворе

При исследовании аэрозолей, полученных из растворов, содержащих феррит кобальта в различных концентрациях отметили, что значения величины пропускания аэрозоля, содержащего малое количество наноматериала (0,025% и 0,05%) резко отличается от значений, полученных при исследовании аэрозоля с большим количеством нанопорошка и от водного аэрозоля (рис. 4). Вероятно, при таком малом содержании

наноматериала получается наиболее гомогенная эмульсия, что обеспечивает образование капель, содержащих достаточное количество порошка. Более высокое содержание порошка, возможно, вызывает осаждение наночастиц в эмульсии, что не позволяет генератору аэрозоля образовывать капли, содержащие достаточное количество частиц, и/или получаются капли по составу и свойствам мало отличимые от водного аэрозоля.

Аэрозоли, полученные из растворов порошка магнетита в концентрациях 0,01% и 0,025%, пропускают излучение меньше, чем водный. При увеличении концентрации порошка в исходном растворе пропускание растет и мало зависит от концентрации. Таким образом, при реализованных условиях, для получения наиболее насыщенного аэрозоля оптимальной является концентрация порошка Fe_3O_4 0,01% или 0,025% (рис. 4).

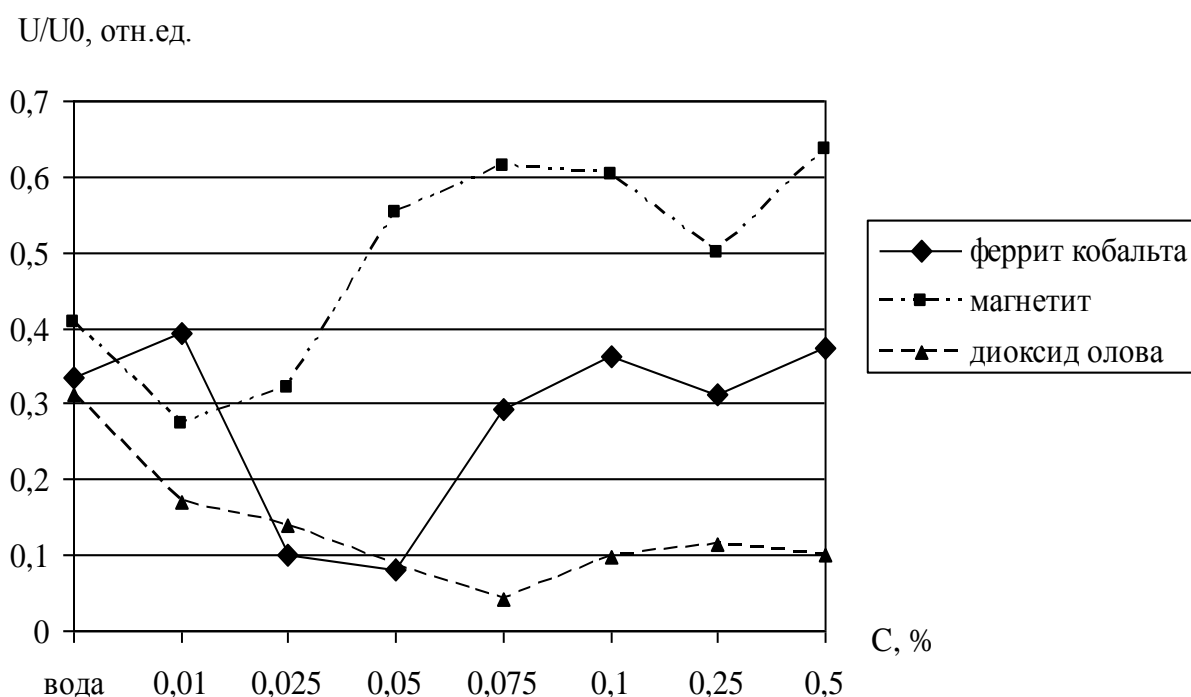


Рисунок 4. Пропускание излучения 0,63мкм воздушно-аэрозольной смесью при вариации концентрации нанопорошка в аэрозольных частицах

По оси абсцисс – концентрация исходного раствора (%)

По оси ординат – коэффициент пропускания U/U_0 (отн. ед.)

Для диоксида олова возможно получение аэрозоля из растворов всех используемых концентраций порошка (рис. 4). В диапазоне концентраций от 0,01% до 0,075% пропускание аэрозоля уменьшается при увеличении содержания наночастиц в исходном растворе. При получении аэрозоля из растворов с концентрацией выше 0,1% пропускание повышается и практически не зависит от количества порошка, что, возможно, свидетельствует о том, что содержание порошка в формируемых каплях не изменяется.

В результате проведенных исследований определены оптимальные концентрации растворов наночастиц для обеспечения возможности проведения ингаляций лабораторных животных и дальнейшего изучения реакций исследуемых объектов на данные воздействия. Для ингаляции животных экспериментальных групп были использованы феррит кобальта в концентрации 0,05%, магнетит – 0,025%, диоксид олова – 0,075%.

2.2. Сократительная активность гладких мышц воздухоносных путей

2.2.1. Объект исследования

В работе использовали экспериментальных животных – половозрелых морских свинок-самцов, весом 200-400 г, в количестве 78 особей. Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществлялось в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Свинок умерщвляли без применения медикаментозного наркоза методом цервикальной дислокации (заключение локального этического комитета СибГМУ №1709 от 29.11.2010г.). После чего вскрывали грудную клетку, выделяли легкие. Воздухоносные пути – трахею и главные бронхи отпрепаровывали при комнатной температуре (20-25 С°) от соединительной ткани, легочной

паренхимы и жира в ванночке с физиологическим раствором Кребса. Для изучения сократительной активности из них приготавливали кольцевые сегменты воздухоносных путей длиной 3-4мм. Эпителий при необходимости удаляли механически, по методу J. Sakici [47], вращением деревянного шпателя в просвете сегмента в течение 1 мин.

2.2.2. Методы исследования

Изучали изменения механического напряжения гладких мышц при введении нанопорошков ингаляционно и непосредственно обрабатывая изолированные сегменты ГМК (*in vitro*).

Для изучения влияния нанопорошков на сократительные реакции гладких мышц при поступлении их *in vivo* животных делили на контрольную группу и три экспериментальные группы, в зависимости от вида ингалируемых наночастиц: феррит кобальта (CoFe_2O_4), магнетит (Fe_3O_4) и диоксид олова (SnO_2).

Ингаляцию нанопорошком проводили ежедневно (курс 4 дня) в течение 30 минут с использованием ультразвукового небулайзера «Муссон-1М». Выходной патрубком генератора аэрозоля соединяли с изолированной камерой, в которой находится животное. Для создания направления потока аэрозоля к ингалятору подключали воздушный компрессор «ELITE-801». Схема установки для проведения ингаляции представлена на рис. 5.

Животных контрольной группы ингалировали дистиллированной водой по аналогичной схеме. На 5 день после окончания курса ингаляции, животных умерщвляли, выделяли легкие, приготавливали кольцевые сегменты трахеи и главных бронхов длиной 3-4 мм.

Для изучения влияния нанопорошков при добавлении их *in vitro*, в рабочую камеру, в которой находились изолированные гладкомышечные сегменты, добавляли водный раствор исследуемых наночастиц.

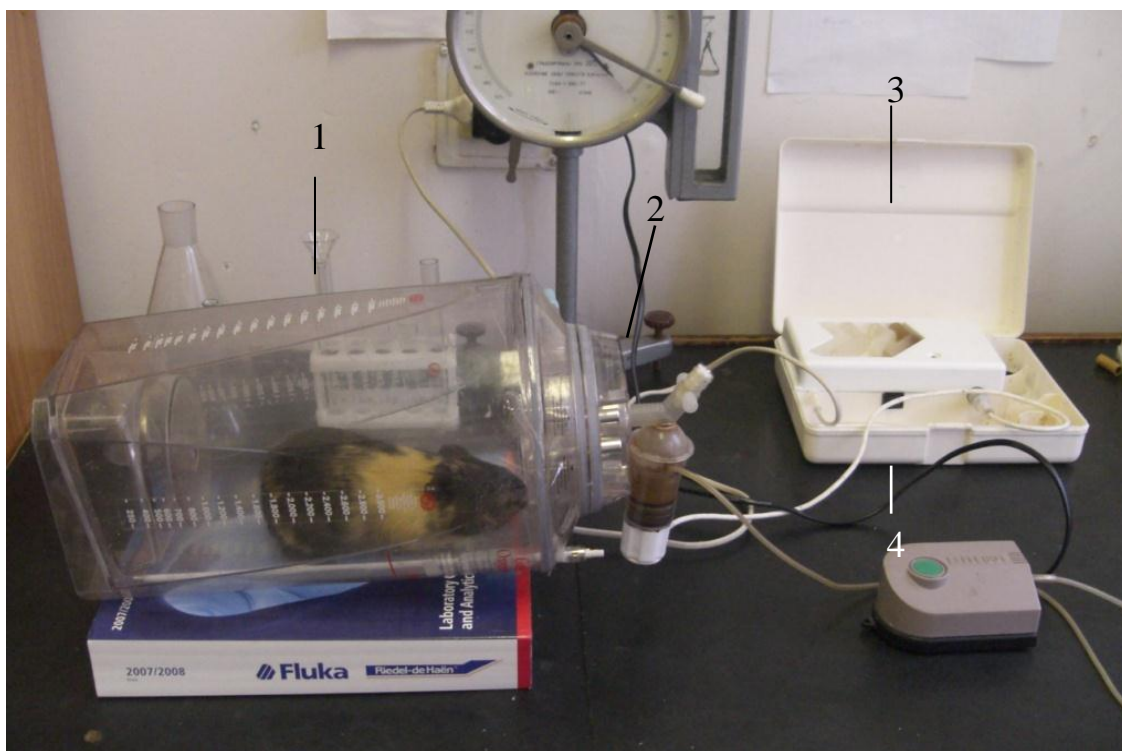


Рисунок 5. Схема установки для ингаляции животных взвесью наноразмерных структур

- 1 – камера для ингаляций,
- 2 – выходной патрубок генератора аэрозоля,
- 3 – генератор аэрозоля,
- 4 – воздушный компрессор.

2.2.3. Метод механографии

Метод механографии применяют для исследования механического напряжения (сократительной активности) гладкомышечных сегментов. На рис. 6. приведена схема экспериментальной механографической установки. Установка включает в себя станину с теплообменником, в крышке которого размещена кювета (объем 4 мл), которая заполнена термостатируемым, аэрируемым раствором Кребса. Во время отмывания каждые 15 мин производили смену раствора, занимающую по времени 1-2 секунды. В кювете закреплены два металлических крючка. Сегменты закрепляли, растягивали нагрузкой 500 мг, фиксировали на штоках механоэлектрических

преобразователей. Датчик силы FT10G использовали в качестве механоэлектрического преобразователя, это позволило проводить эксперимент в условиях, близких к изометрическим. Сигнал с датчиков подается на АЦП и регистрируется с помощью персонального компьютера.

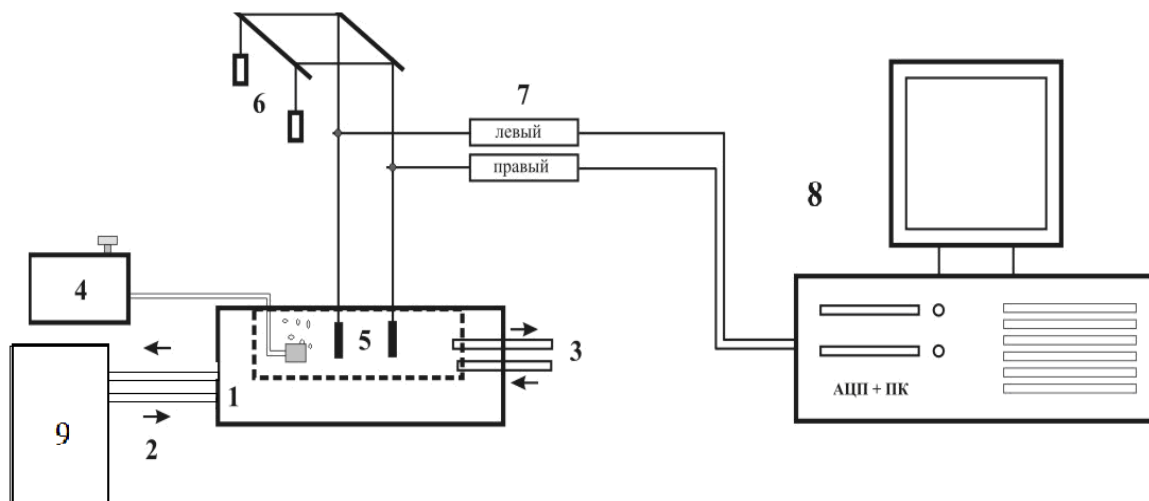


Рисунок 6. Схема двухканальной механографической установки

- 1 – кювета,
- 2 – соединение кюветы с термостатом,
- 3 – трубки для смены растворов,
- 4 – выход аэратора,
- 5 – кольцевые сегменты воздухоносных путей на крючках,
- 6 – нагрузка,
- 7 – датчики силы,
- 8 – регистрирующий компьютер с АЦП и соответствующим программным обеспечением,
- 9 – термостат.

Эффекты действия биологически активных веществ на ГМК оценивали в процентах от амплитуды контрольного сокращения сегментов развивающегося на добавление стандартной концентрации КС1 (40 мМ), её

принимали за 100%. На основании полученных результатов строили кривые “доза-эффект”.

Роль эпителия на величину сокращения определяли сравнением реакций интактных и деэпителизированных сегментов ВП.

2.2.4. Растворы и реактивы

Используемые растворы приготавливали на основе дистиллированной воды.

Нормальный раствор Кребса : NaCl - 120,4 мМ; KCl - 5,9 мМ; MgCl₂ - 1,2 мМ; CaCl₂ - 2,5 мМ; глюкоза - 11,5 мМ; трис(оксиметил)-аминометан - 15,5 мМ. Все соли используемые для приготовления раствора Кребса - ХЧ (производство Реахим, РФ). рН растворов поддерживали в пределах 7,4±0,05 при температуре 34⁰С.

Используемые реактивы: трис(оксиметил)-аминометан (China), гистамин (ICN Biomedicals, Inc., США), карбахолин (ICN Biomedicals, Inc., США), сальбутамол (Sigma, Франция). Нанопорошки феррита кобальта (CoFe₂O₄), магнетита (Fe₃O₄) и диоксида олова (SnO₂) приготавливали на базе отдела структурной макрокинетики ТНЦ СО РАН методом механохимического синтеза из солевых систем. Порошок наноразмерного CoFe₂O₄ состоит из сферических наноразмерных зерен (3-15 нм) слабо связанных друг с другом, 65% составляет доля частиц диаметром от 4 до 8 нм. Магнетит включает частицы сферической формы, диаметром 3-14 нм, из них 60% попадают в диапазон 3-7 нм [26]. В пробе наноразмерных частиц SnO₂ 40 мас% составляет легкая фракция сферической формы, размером 3-20 нм, остальная часть пробы – слабоагрегированные частицы размером 40-80 нм [17].

2.2.5. Статистическая обработка результатов

Анализ полученных данных проводили с использованием программы Statistica 6.0 for Windows фирмы Statsoft. Все данные представлены в виде

$M \pm m$, где принято M – среднее, m – ошибка среднего. Статистически значимым считали различия при $p < 0,05$. Далее по тексту принято: n – объем группы, p – уровень значимости.

Критерий нормальности Колмогорова-Смирнова был использован для определения характера распределения полученных данных. Поскольку сформированные выборки не отвечали требованию закона нормального распределения, для проверки статистических гипотез использовали непараметрические критерии [9].

U-критерий Манна-Уитни использовали для проверки гипотезы об однородности двух независимых выборок. Метод использовали при сравнении групп сегментов полученных от интактных животных и от животных ингалированных нанопорошками. T-критерий Вилкоксона использовали для проверки однородности парных или зависимых выборок. Применяли для сравнения амплитуды механического напряжения сегментов при воздействии на них биологически-активных веществ с исходным механическим напряжением.

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Механическое напряжение гладких мышц воздухоносных путей в условиях ингаляционного введения наночастиц

Воздухоносный тракт – один из наиболее возможных путей поступления наночастиц в организм. Вдыхание наноразмерных материалов взвешенных в воздухе возможно при производстве, промышленном применении нанопорошков. Для оценки риска таких взаимодействий применяют моделирование ингаляционного поступления наночастиц с использованием лабораторных животных. При обработке нанопорошками биоматериала в условиях *in vitro* возможно изучить механизмы и последствия взаимодействия наноразмерных частиц непосредственно с исследуемым органом или тканью.

В предварительных экспериментах определили концентрацию гиперкалиевого раствора Кребса, вызывающего полумаксимальное сокращение сегментов бронхов. Концентрация составила 40 мМ КСl. Выбор предсокращающего фактора обоснован тем, что механизм развития калиевой контрактуры обусловлен потенциалзависимым входом ионов Ca^{2+} , без участия других сигнальных путей [28, 30].

3.1.1. Особенности холинергической регуляции сократительных реакций гладких мышц воздухоносных путей морских свинок при ингаляционном введении наночастиц феррита кобальта, магнетита и диоксида олова

Для оценки особенностей холинергической регуляции сократительных реакций ГМ использовали карбахолин в диапазоне концентраций 0,01 мкМ-10 мкМ. Карбахолин – неселективный холиномиметик, эфир холина и карбаминовой кислоты, оказывает слабое и длительное контрактильное действие на ГМК воздухоносных путей. Никотиновые холинергические

рецепторы являются неспецифическими ионными каналами, которые проницаемы для ионов Na^+ и K^+ . Мускариновые рецепторы разделяют на подтипы в соответствии с их способностью мобилизовать внутриклеточный кальций (M1, M3, M5) или ингибировать аденилатциклазу (M2, M4). Стимуляция M1, M3, M5 рецепторов активирует фосфолипазу C посредством G-белка, что увеличивает синтез вторичного мессенджера инозитолтрифосфата и диацилглицерола. Диацилглицерол активирует протеинкиназу-C, инозитолтрифосфат освобождает ионы кальция из эндоплазматического ретикулума. M2, M4 рецепторы при участии G-белков ингибируют аденилатциклазу, приводя к уменьшению внутриклеточного уровня цАМФ [8].

При действии карбахолина сегменты всех исследуемых групп отвечали дозозависимым сокращением. Внешний вид механограмм полученных при обработке ГМ сегментов карбахолином представлен рис. 7.

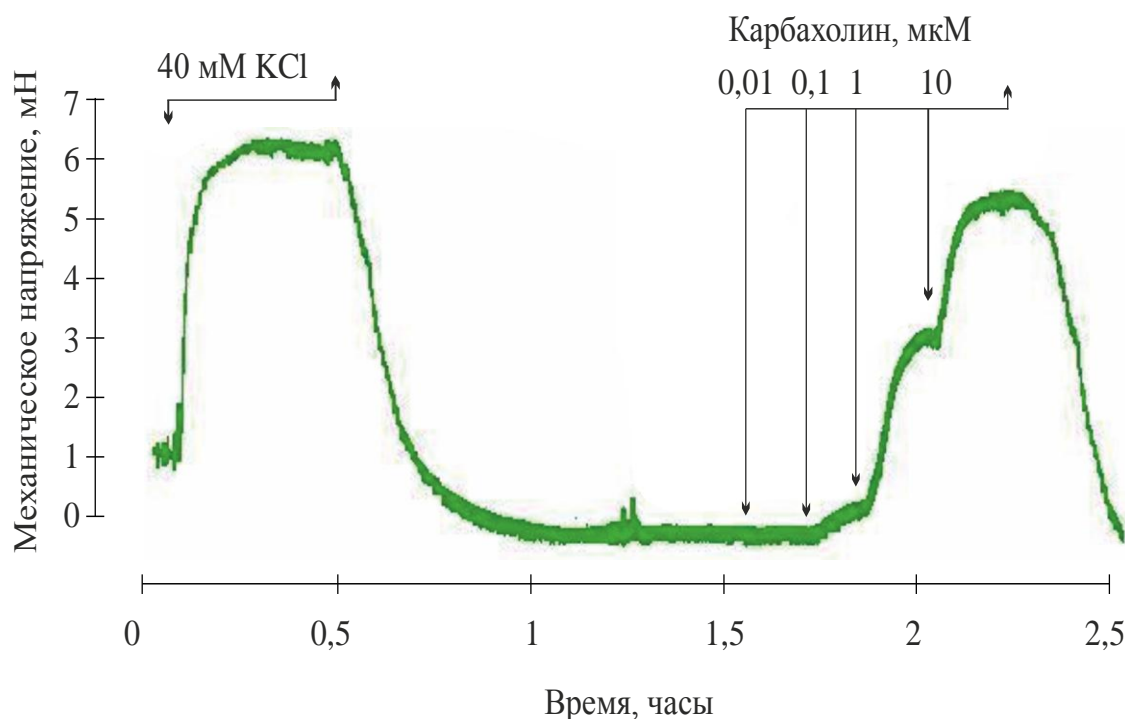


Рисунок 7. Влияние карбахолина на механическое напряжение гладкомышечных сегментов воздухоносных путей (деэпителизированные сегменты контрольной группы)

По оси ординат – механическое напряжение сегментов (мН). По оси абсцисс – время действия вещества (часы). Стрелками показано добавление и удаление

растворов.

В зависимости от способа обработки ГМ нанопорошками, наличия или отсутствия эпителия на сегментах наблюдали различия величины механического напряжения.

При сравнении величины амплитуд сокращений интактных сегментов ВП морских свинок ингалированных аэрозолями, содержащими наночастицы феррита кобальта и магнетита с сегментами ВП контрольной группы на действие карбахолина, выяснили что различия в величинах механического напряжения являются статистически значимыми в диапазоне концентраций 0,1–10 мкМ ($p < 0,05$) (рис. 8). При этом величина механического напряжения сегментов экспериментальных групп больше контрольной. Кроме того, в результате ингаляций изменялась величина EC_{50} в сторону уменьшения по сравнению с контрольной группой. EC_{50} контрольной группы 4,34 мкМ, 2,64 мкМ при ингаляции $CoFe_2O_4$, 0,31 мкМ при ингаляции Fe_3O_4 . В последнем случае изменение было статистически значимо ($p < 0,05$).

При действии карбахолина на деэпителизированные сегменты наибольшую амплитуду сокращения наблюдали у сегментов полученных от животных, ингалированных магнетитом, повышение являлось статистически значимым в области концентраций 0,01–10 мкМ ($p < 0,05$). Статистически значимых различий между амплитудами сократительных ответов группы контроля и сегментов животных ингалированных диоксидом олова и ферритом кобальта выявлено не было. При этом наблюдалось снижение величины EC_{50} экспериментальных групп, по сравнению с контролем (рис. 9).

Таким образом, увеличение механического напряжения развиваемого интактными и деэпителизованными сегментами ВП животных, ингалированных нанопорошками, наблюдали при использовании всех исследуемых наночастиц. Кроме того, отмечали снижение величины EC_{50} , по сравнению с контрольными группами.

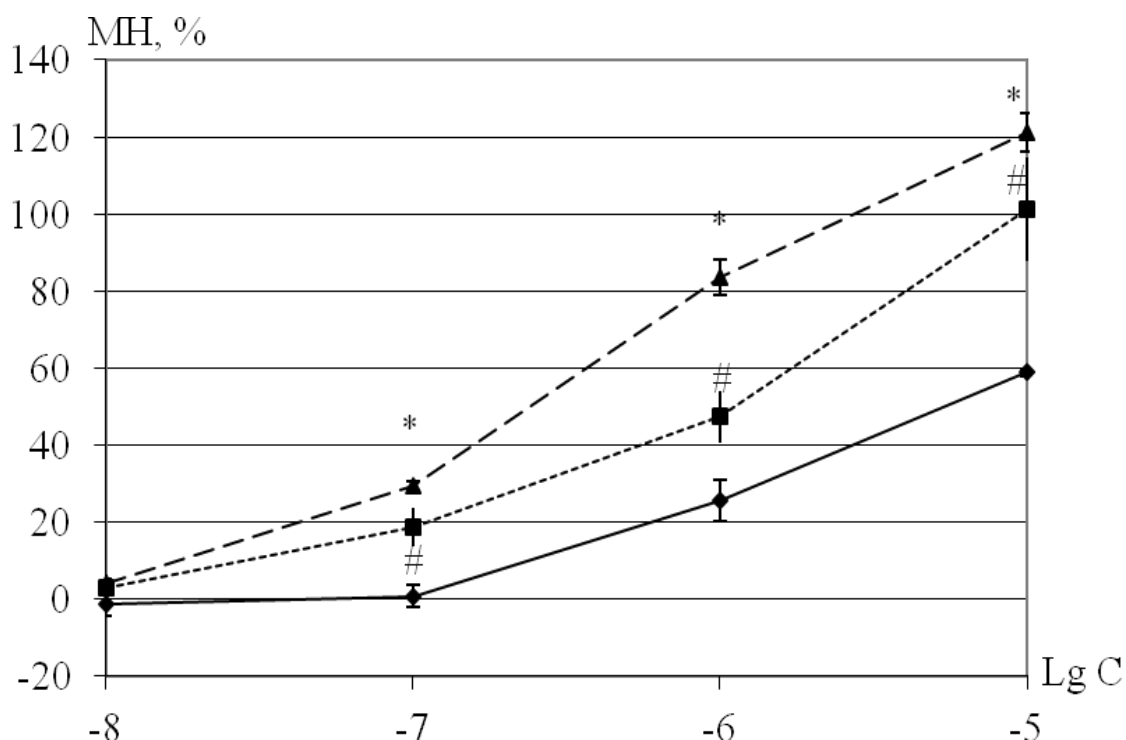


Рисунок 8. Зависимость механического напряжения интактных гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок от концентрации карбахолина

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %). По оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации карбахолина (Lg C).

Сплошная линия – интактные сегменты воздухоносных путей животных контрольной группы

Пунктирная линия – интактные сегменты воздухоносных путей животных ингалированных наночастицами магнетита.

Мелкий пунктир – интактные сегменты воздухоносных путей животных ингалированных наночастицами феррита кобальта.

* – статистическая значимость различий величины амплитуд сократительных реакций сегментов воздухоносных путей животных контрольной группы и ингалированных наночастицами магнетита, ($p < 0,05$)

– статистическая значимость различий величины амплитуд сократительных реакций сегментов воздухоносных путей животных контрольной группы и ингалированных наночастицами феррита кобальта, ($p < 0,05$).

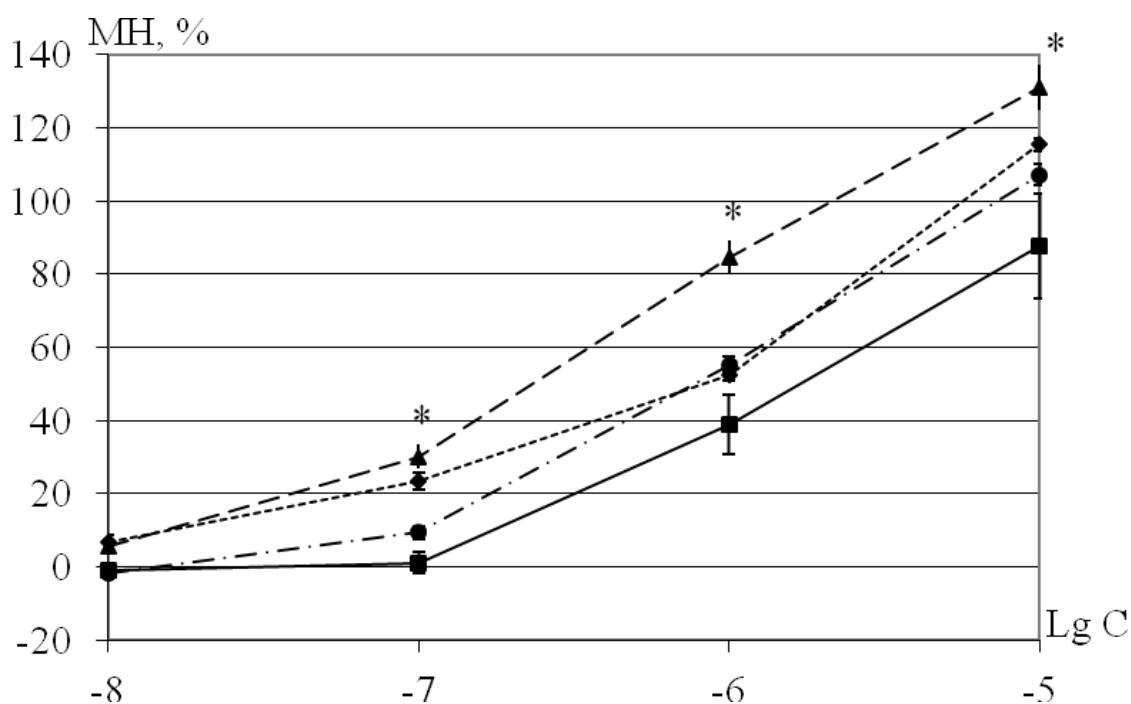


Рисунок 9. Зависимость механического напряжения деэпителизированных гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок от концентрации карбахолина

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %). По оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации карбахолина (Lg C).

Сплошная линия – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей животных контрольной группы

Пунктирная линия – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей животных ингалированных наночастицами магнетита.

Мелкий пунктир – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей животных ингалированных наночастицами феррита кобальта.

Штрих-пунктир - деэпителизированные сегменты воздухоносных путей животных ингалированных наночастицами диоксида олова.

* – статистическая значимость различий величины амплитуд сократительных реакций сегментов воздухоносных путей животных контрольной группы и ингалированных наночастицами магнетита, ($p < 0,05$).

Считается, при астме в условиях *in vivo* развивающаяся дисфункция M₂-холинорецепторов играет одну из важных ролей в развитии гиперреактивности. При повреждении M₂-холинорецепторов вследствие сенсibilизации возникает нарушение замедления выхода ацетилхолина при стимуляции блуждающего нерва, как это происходит в норме, в результате формируется бронхиальная гиперреактивность. При этом не отмечается нарушений функции M₃-холинорецепторов [41]. При этом установлено, что количество M₃-холинорецепторов присутствующих в воздухоносных путях повышено у морских свинок сенсibilизированных овальбумином, тогда как не изменяется плотность M₂-рецепторов [131].

Таким образом, изменение величины сократительных реакций развиваемых изолированными гладкомышечными сегментами воздухоносных путей на воздействие карбахолина может объясняться изменением количества холинорецепторов, а так же увеличением чувствительности к агонистам, о чем свидетельствует снижение величины EC₅₀ в экспериментальных группах. Однако, ввиду малой изученности возможных изменений рецепторного поля при вдыхании наночастиц нельзя исключить и другие механизмы формирования гиперреактивности и повышенной чувствительности к агонистам.

3.1.2. Особенности гистаминергической регуляции сократительных реакций гладких мышц воздухоносных путей при ингаляционном введении наночастиц феррита кобальта, магнетита и диоксида олова

Посредством воздействия на рецепторный аппарат реализуется фармакологическое действие гистамина. Взаимодействуя со специфическими к гистамину рецепторами, происходит активация рецепторуправляемого входа Ca²⁺ в клетку, из внутриклеточных депо освобождается Ca²⁺, активируется фосфолипаза-С, в результате чего происходит сокращение ГМ [28, 39].

Изучали влияние действия гистамина (концентрации 0,01 мкМ – 10 мкМ) на сократительную активность гладкомышечных сегментов воздухоносных путей морских свинок. При данном виде воздействия сегменты всех исследуемых групп отвечали дозозависимым сокращением. Внешний вид механограмм полученных при обработке сегментов ГМ гистамином представлен на рис. 10. Направленность реакций была подобной при изучении всех сформированных групп, отличия наблюдали в величине развиваемого сокращения.

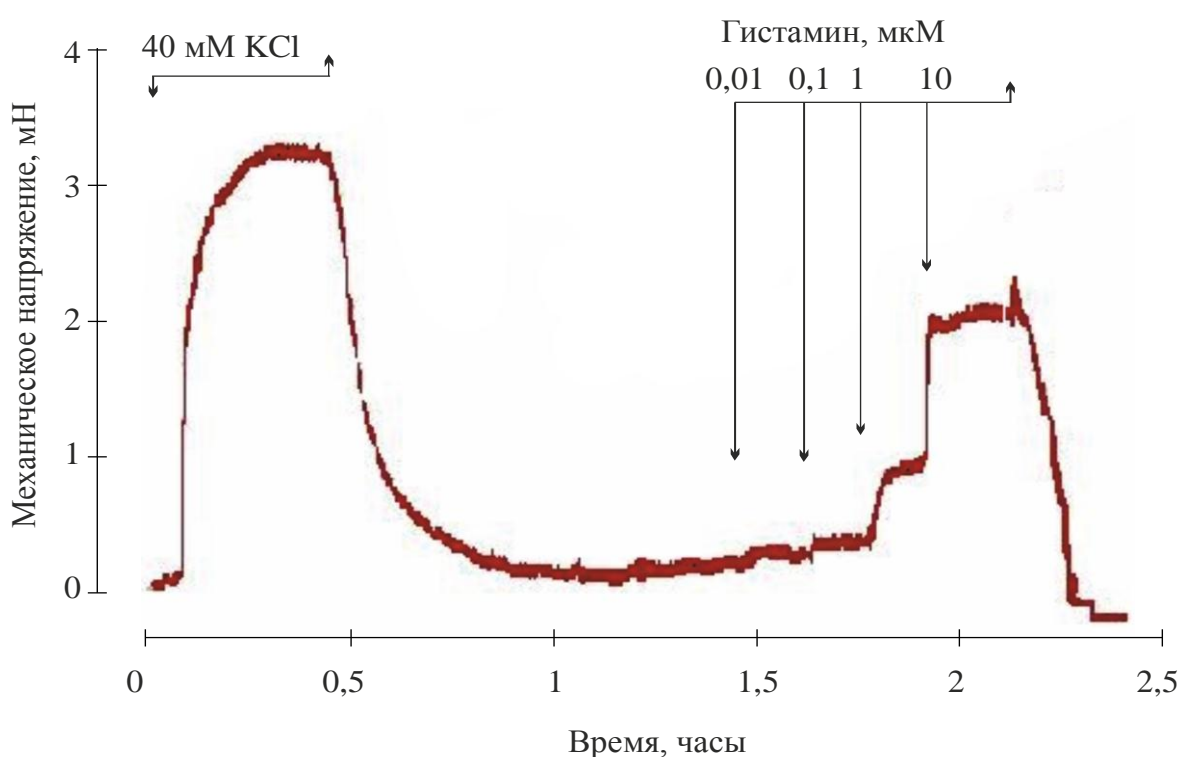


Рисунок 10. Влияние гистамина на механическое напряжение гладкомышечных сегментов воздухоносных путей (сегменты контрольной группы, дезэпителизированные)

По оси ординат – механическое напряжение сегментов (мН). По оси абсцисс – время действия вещества (часы).

Стрелками показано добавление и удаление растворов.

Были проведены серии экспериментов для изучения влияния гистамина на сократительную активность сегментов бронхов морских свинок

ингазированных аэрозолями, содержащими наночастицы феррита кобальта, магнетита и диоксида олова. Использовали гистамин в диапазоне концентраций 0,01 мкМ–10 мкМ.

На добавление гистамина в диапазоне концентраций 0,1–10 мкМ сегменты, полученные от животных ингазированных нанопорошком феррита кобальта и магнетита отвечали дозозависимым сокращением. Максимальная амплитуда сокращения интактных сегментов экспериментальных групп составила $75,52 \pm 11,22\%$ ($n=6$), $EC_{50}=2,64$ мкМ (при ингаляции ферритом кобальта) и $41,59 \pm 10,47\%$ ($n=6$) (при ингаляции магнетитом).

При сравнении величины механического напряжения интактных сегментов морских свинок ингазированных аэрозолями, содержащими наночастицы феррита кобальта и магнетита с сегментами контрольной группы на воздействие гистамина, выяснили что различия являются статистически значимыми в диапазоне концентраций 1–10 мкМ для сегментов, полученных от животных ингазированных ферритом кобальта ($p<0,05$) (рис. 11).

При действии гистамина на деэпителизированные сегменты наибольшую амплитуду сокращения наблюдали у сегментов полученных от животных, ингазированных диоксидом олова $112,34 \pm 5,95\%$ ($n=6$, $p<0,05$) (рис.12). Так же статистически значимыми стали различия величин механического напряжения сегментов, полученных от животных ингазированных ферритом кобальта ($p<0,05$). Статистически значимых различий между амплитудами сократительных ответов группы контроля и сегментов животных ингазированных магнетитом выявлено не было. При этом происходило увеличение чувствительности гладких мышц к гистамину, о чем свидетельствует снижение EC_{50} по сравнению с контрольным.

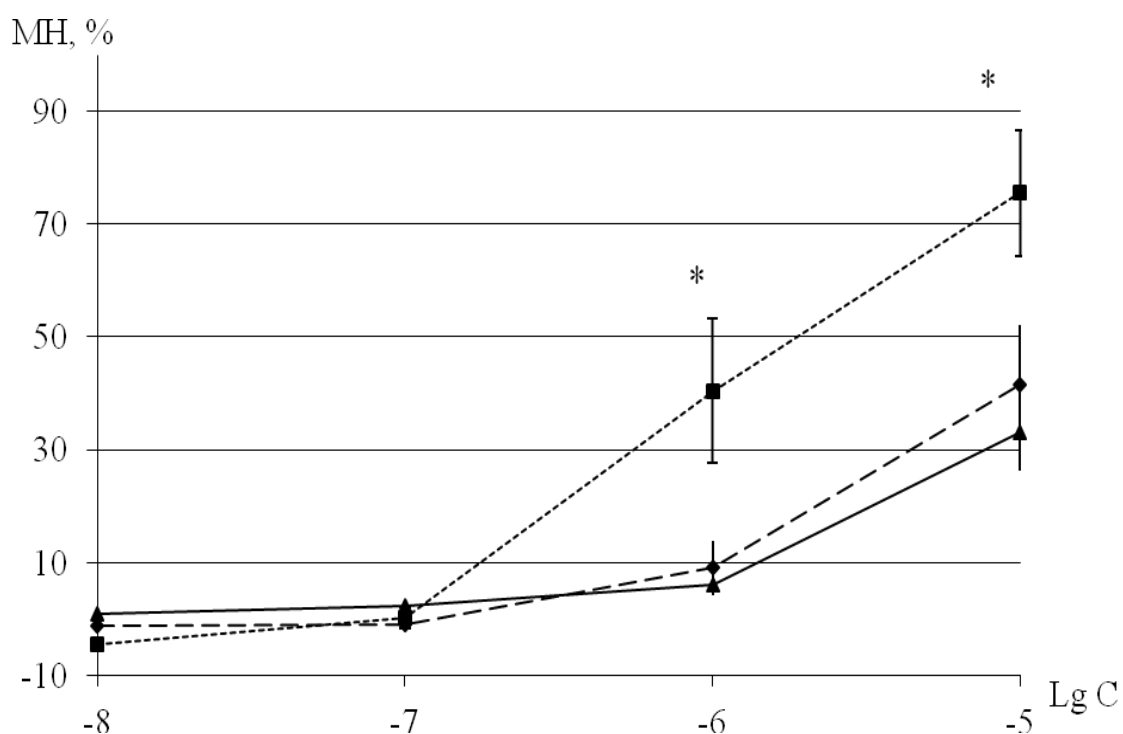


Рисунок 11. Зависимость механического напряжения интактных гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок от концентрации гистамина

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).

Сплошная линия – интактные сегменты воздухоносных путей животных контрольной группы

Пунктирная линия – интактные сегменты воздухоносных путей животных ингалированных наночастицами магнетита.

Мелкий пунктир – интактные сегменты воздухоносных путей животных ингалированных наночастицами феррита кобальта.

* – статистическая значимость различий величины амплитуд сократительных реакций сегментов воздухоносных путей животных контрольной группы и ингалированных наночастицами феррита кобальта, ($p < 0,05$).

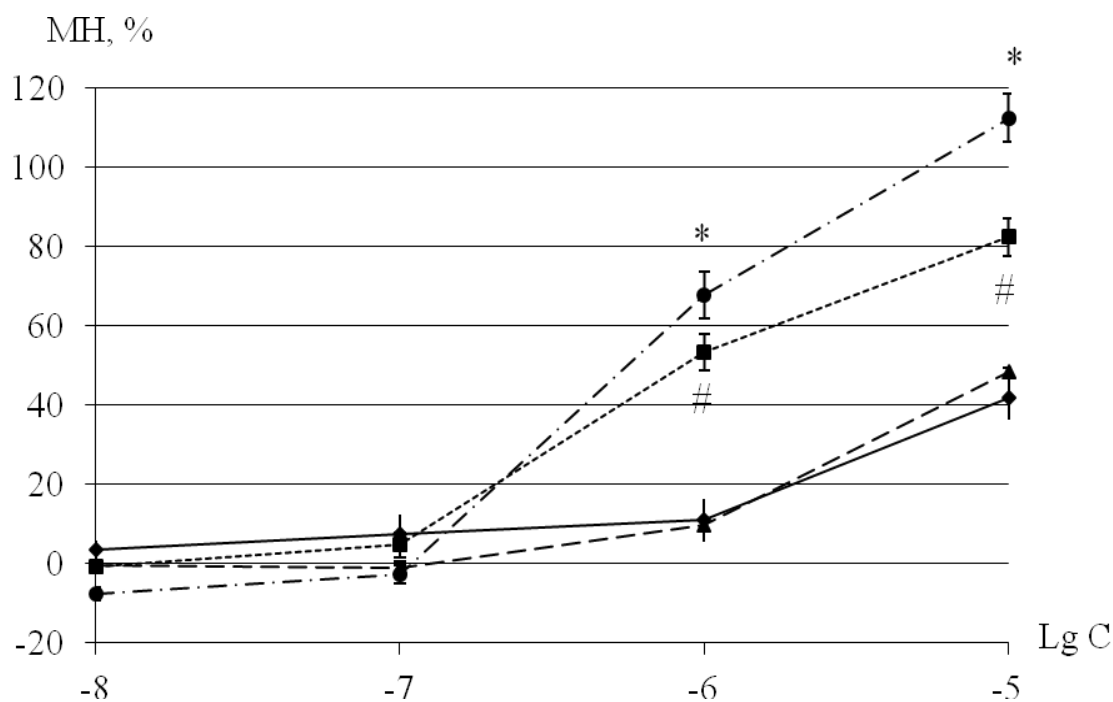


Рисунок 12. Зависимость механического напряжения деэпителизированных гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок от концентрации гистамина

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %). По оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации карбахолина (Lg C).

Сплошная линия – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей животных контрольной группы

Пунктирная линия – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей животных ингалированных наночастицами магнетита.

Мелкий пунктир – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей животных ингалированных наночастицами феррита кобальта.

Штрих-пунктир - деэпителизированные сегменты воздухоносных путей животных ингалированных наночастицами диоксида олова.

* – статистическая значимость различий величины амплитуд сократительных реакций сегментов воздухоносных путей животных контрольной группы и ингалированных наночастицами диоксида олова, ($p < 0,05$);

– статистическая значимость различий величины амплитуд сократительных реакций сегментов воздухоносных путей животных контрольной группы и ингалированных наночастицами феррита кобальта, ($p < 0,05$).

Амплитуда сокращения деэпителизированных сегментов, выделенных от ингалированных животных, была статистически значимо выше чем амплитуда сокращения сегментов с удаленным эпителием контрольной группы. Полученный результат может объясняться увеличением в мембране ГМ воздухоносных путей количества рецепторов к гистамину, при условии ингаляционного введения наночастиц, подобно тому, как повышается экспрессия рецепторов гистамина первого типа при овалбумин-опосредованной гиперреактивности [117].

Возрастание максимальной амплитуды сокращения интактных сегментов ингалированных животных по сравнению с контролем может свидетельствовать о повреждении эпителия воздухоносных путей, вследствие чего наночастицы способны в большей степени оказывать воздействие на ГМК. С другой стороны это может быть вызвано более низким количеством факторов расслабления нарабатываемых эпителием. Изменение функционирования эпителия может происходить при нарушении липидного состава мембран [43] или действия наночастиц на элементы цитоскелета посредством взаимодействия с мембраносвязанными белками [110].

3.1.3. Особенности адренергической регуляции сократительной активности гладких мышц воздухоносных путей при ингаляционном введении наночастиц феррита кобальта, магнетита и диоксида олова

Адренергическую регуляцию ГМ изучали при действии агониста β_2 -адренорецепторов сальбутамола в концентрации 0,01 мкМ–10 мкМ.

β_2 -агонисты вызывают расслабление гладких мышц трахеи и бронхов, уменьшают секреторную функцию бронхиальных желез. При действии агонистов β_2 -адренорецепторов запускается эффекторный механизм, приводящий к активации аденилатциклазы и увеличению количества внутриклеточного цАМФ, который способствует расслаблению ГМ за счет влияния на кальциевые насосы плазмолеммы и саркоплазматического

ретикулума, а также фосфорилирования киназы легких цепей миозина [8, 121].

Изучили влияние салбутамола на механическое напряжение ГМ на фоне предсокращения гиперкалиевым раствором Кребса. Механограмма представлена на рис. 13.

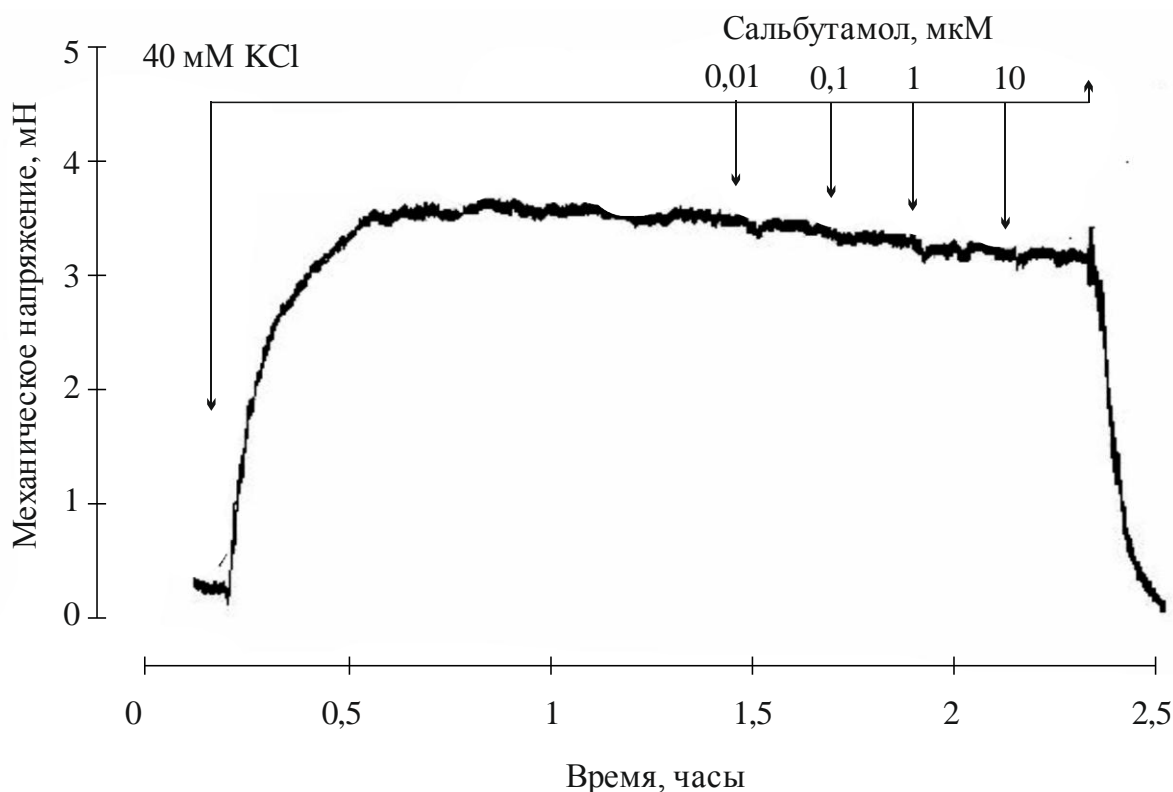


Рисунок 13. Влияние салбутамола на механическое напряжение гладкомышечных сегментов воздухоносных путей (сегменты контрольной группы, дезэпителизированные)

По оси ординат – механическое напряжение сегментов (мН). По оси абсцисс – время действия вещества (часы).

Стрелками показано добавление и удаление растворов.

Было установлено, что при действии салбутамолом на дезэпителизированные сегменты морских свинок контрольной группы, все сегменты отвечали дозозависимым расслаблением на воздействие салбутамола в концентрациях 0,01 мкМ –10 мкМ (рис. 14). Сегменты ВП

животных, ингалированных аэрозолями, содержащими наночастицы, также отвечали дозозависимым расслаблением при действии сальбутамола.

Величина амплитуды расслабления сегментов группы контроля ($83,21 \pm 5,61\%$ ($n=19$)) была более выражена по сравнению с экспериментальными группами ($93,80 \pm 4,95\%$ - ингаляции ферритом кобальта ($n=6$), $96,67 \pm 2,81\%$ - магнетитом ($n=6$), $97,04 \pm 1,29\%$ – диоксидом олова ($n=6$)). Эти различия не являлись статистически значимыми (рис. 14).

Ингаляционное воздействие наночастицами ведет к уменьшению амплитуды расслабления ГМ, по сравнению с контролем. Данные результаты позволяют предполагать о возможности снижения количества адренорецепторов в гладких мышцах или их чувствительности к агонистам при вдыхании наноматериалов. В литературе описано уменьшение количества β_2 -адренорецепторов как в эпителии, так и в гладких мышцах при сенсibilизации животных [10].

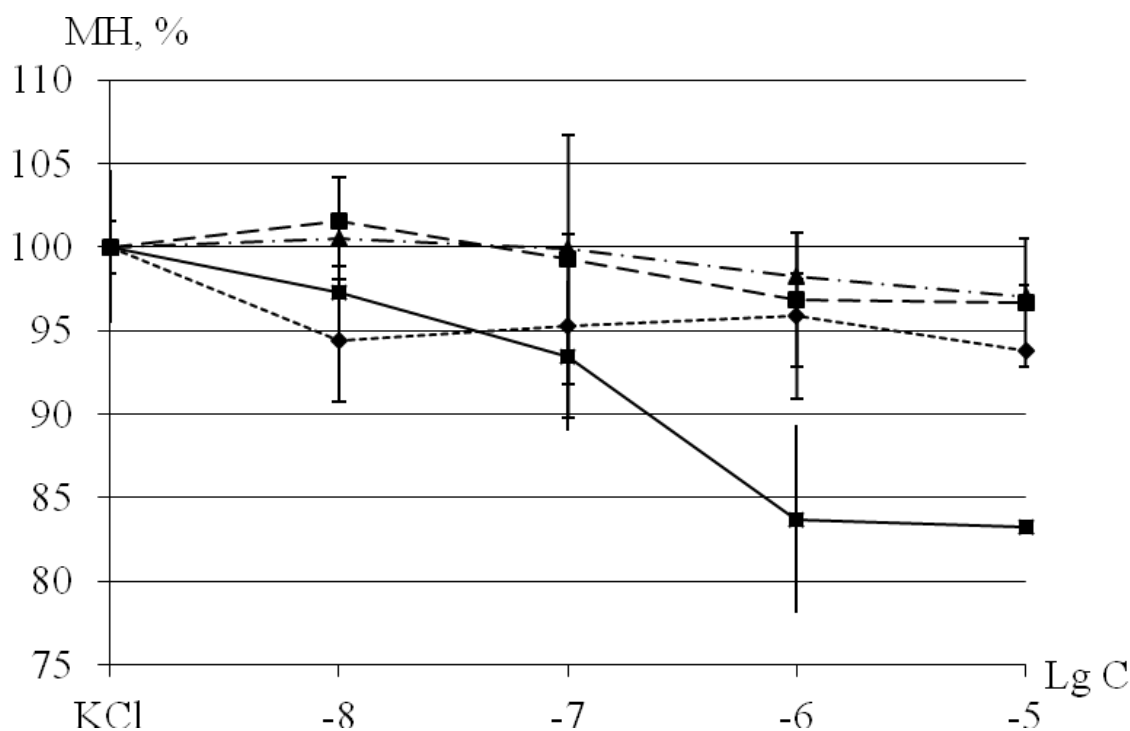


Рисунок 14. Зависимость механического напряжения деэпителизированных гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, от концентрации сальбутамола.

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

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

Сплошная линия – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей животных контрольной группы

Пунктирная линия – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей животных ингалированных наночастицами магнетита.

Мелкий пунктир – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей животных ингалированных наночастицами феррита кобальта.

Штрих-пунктир - деэпителизированные сегменты воздухоносных путей животных ингалированных наночастицами диоксида олова.

Далее изучили влияние сальбутамола на механическое напряжение ГМ на фоне предсокращения гистамином.

Механограмма, получаемая при подобных условиях эксперимента представлена на рис. 15.

Предсокращение проводили, используя гистамин в концентрациях, вызывающих полумаксимальное сокращение сегментов. Для сегментов контрольной группы и при обработке сегментов *in vitro* 7,7 мкМ, для сегментов, полученных от животных проингазированных нанопорошками феррита кобальта – 0,45 мкМ, магнетита – 3,31 мкМ, диоксида олова – 2,35 мкМ.

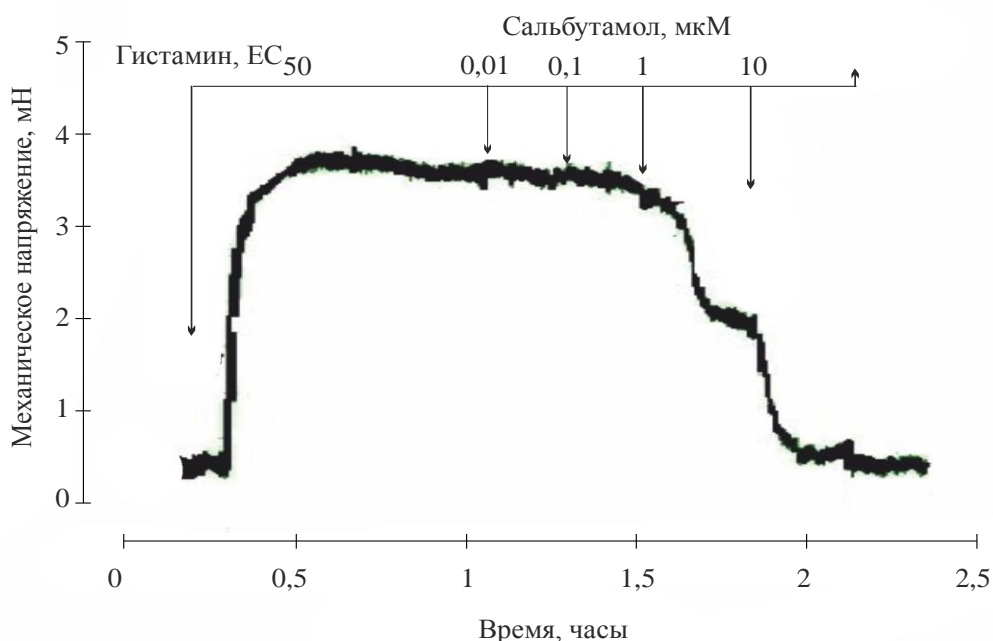


Рисунок 15. Влияние сальбутамола на механическое напряжение гладкомышечных сегментов воздухоносных путей (сегменты контрольной группы, дезпителизированные)

По оси ординат – механическое напряжение сегментов (мН). По оси абсцисс – время действия вещества (часы).

Стрелками показано добавление и удаление растворов.

Все исследуемые сегменты отвечали дозозависимым расслаблением, по величине превосходящим амплитуду расслабления, вызванную

сальбутамолом при условии предсокращения сегментов гиперкалиевым раствором Кребса.

При условии предсокращения гистамином, деэпителизированные сегменты контрольной группы, в ответ на воздействие сальбутамола в диапазоне концентраций 0,01 мкМ – 10 мкМ отвечали дозозависимым расслаблением. Максимальная амплитуда расслабления составила $-6,22 \pm 2,68\%$ ($EC_{50}=0,022$ мкМ, $n=10$) на концентрацию сальбутамола 10 мкМ. Величины амплитуд расслабления сегментов ВП животных ингалированных магнетитом и диоксидом олова ($-8,69 \pm 3,93$ ($EC_{50}=0,035$ мкМ, $n=10$) и $-6,34 \pm 1,95\%$ ($EC_{50}=0,005$ мкМ, $n=7$) соответственно) не отличались от контрольной.

Механическое напряжение сегментов ВП животных ингалированных нанопорошками феррита кобальта статистически значимо отличалось от контрольного при действии сальбутамола в диапазоне концентраций 10–1 мкМ и достигало значения $-47,55 \pm 8,76\%$ $EC_{50}=0,088$ мкМ ($n=9$, $p<0,05$) (рис. 16).

Таким образом, действие наноразмерных материалов на ГМ при ингаляционном введении вызывает изменение величины механического напряжения в ответ на действие сальбутамола. Изменения амплитуды сокращения являлись статистически значимыми, по сравнению с контролем только в случае ингаляции ферритом кобальта. При этом величина расслабления при действии сальбутамола зависит от вида предсокращающего агента. При использовании гистамина наблюдали более выраженное расслабление во всех сформированных экспериментальных и контрольных группах.

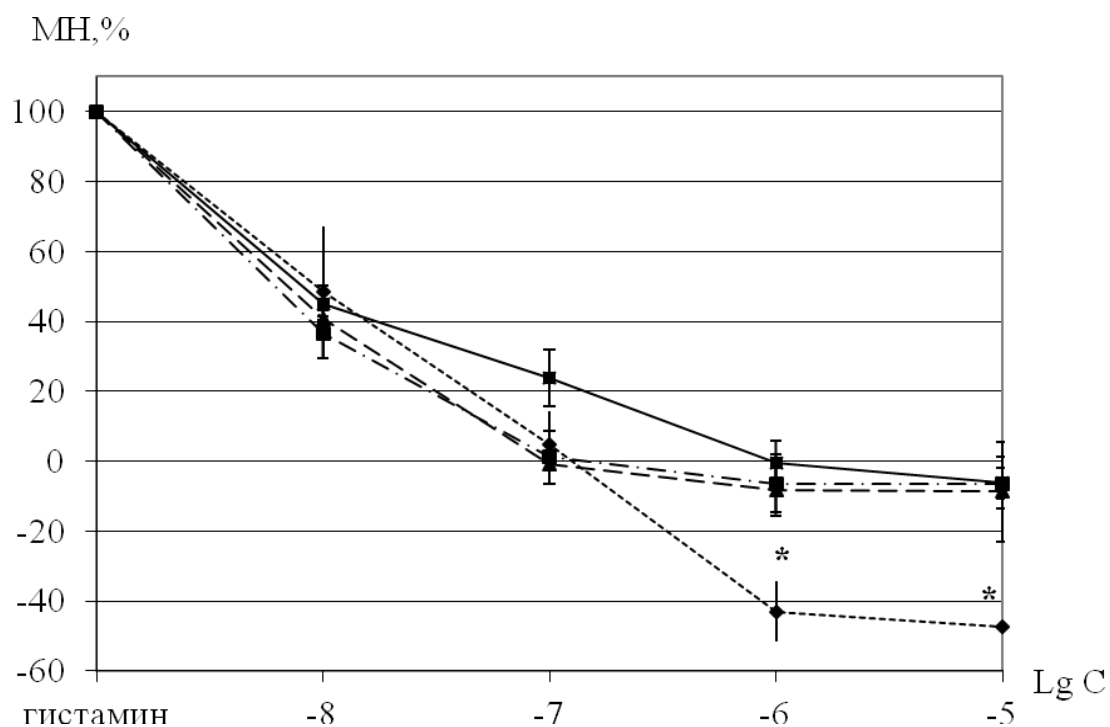


Рисунок 16. Зависимость механического напряжения деэпителизированных гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок, предсокращенных гистамином, от концентрации сальбутамола

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %). По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации сальбутамола (Lg C).

Сплошная линия – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей животных контрольной группы

Пунктирная линия – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей животных ингалированных наночастицами магнетита.

Мелкий пунктир – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей животных ингалированных наночастицами феррита кобальта.

Штрих-пунктир - деэпителизированные сегменты воздухоносных путей животных ингалированных наночастицами диоксида олова.

* – статистическая значимость различий величины амплитуд сократительных реакций сегментов воздухоносных путей животных контрольной группы и ингалированных наночастицами феррита кобальта ($p < 0,05$).

3.2. Механическое напряжение гладких мышц воздухоносных путей в условиях введения наночастиц *in vitro*

3.2.1. Особенности холинергической регуляции сократительных реакций гладких мышц воздухоносных путей морских свинок при действии наночастиц феррита кобальта, магнетита и диоксида олова *in vitro*

Для оценки влияния взвеси нанодисперсных частиц на холинергические сократительные реакции воздухоносных путей морских свинок, в рабочую камеру с сегментами добавляли эмульсию, содержащую нанопорошки (концентрация 0,3 мг/мл, время действия 15 минут), далее использовали карбахолин в диапазоне концентраций 0,01 мкМ–10 мкМ. При воздействии карбахолином, сегменты отвечали дозозависимым сокращением.

Сравнивая величины механического напряжения интактных сегментов группы контроля и сегментов, обработанных нанопорошком феррита кобальта в условиях *in vitro* наблюдали статистически значимые различия величины амплитуды сокращения в диапазоне концентраций карбахолина 1–10 мкМ ($p < 0,05$) (рис. 17). При этом механическое напряжение сегментов группы контроля было выше, величина EC_{50} была ниже (4,34 мкМ), чем в экспериментальной группе (5,57 мкМ).

Интактные сегменты, обработанные магнетитом *in vitro*, развивали механическое напряжение большее по величине, чем сегменты контрольной группы. Данные различия являлись статистически значимыми в диапазоне концентраций карбахолина 0,1–10 мкМ ($p < 0,05$), величина EC_{50} составила 2,11 мкМ.

Амплитуда сокращения деэпителизированных сегментов экспериментальных групп различается незначительно, статистически значимые различия наблюдали исследуя сегменты обработанные магнетитом и диоксидом олова при действии на них карбахолина в концентрациях 0,1–1 мкМ ($p < 0,05$) (рис. 18). Величина EC_{50} для них составила 1,29 мкМ и

0,67 мкМ соответственно, для группы контроля эта величина была выше 2,95 мкМ. Данные различия так же являлись статистически значимыми ($p < 0,05$).

Таким образом, различия механического напряжения интактных и деэпителизированных сегментов, при обработке нанопорошком *in vitro*, являются более значимыми, чем при ингаляционном введении наночастиц. Это может быть связано с тем, что в данном случае не происходило прижизненного повреждения эпителия ВП [43], и в условиях воздействия карбахолином эпителий обеспечивал выработку достаточного количества факторов расслабления.

Интактные сегменты, обработанные магнетитом и ферритом кобальта проявили противоположную направленность изменения сократительной активности, что дает основания полагать о влиянии состава нанопорошков на механизм или степень изменений клеточного функционирования.

Деэпителизированные сегменты обработанные наночастицами феррита кобальта, магнетита и диоксида олова имели малую величину различий амплитуды сокращений, при этом сегменты группы контроля развивали сократительный ответ меньшей силы. Повышение уровня сократительного ответа и снижение величины EC_{50} позволяет предполагать об увеличении биодоступности БАВ вследствие его взаимодействия с наночастицами в рабочем растворе и, увеличения адгезивных свойств, либо вследствие изменения структуры мембраны ГМК или ее компонент при действии наноматериала. Кроме того, данные изменения могут быть обусловлены действием наночастиц на компоненты цитоскелета и возможным изменением регуляции сигнальных путей, задействованных в развитии сокращения ГМ.

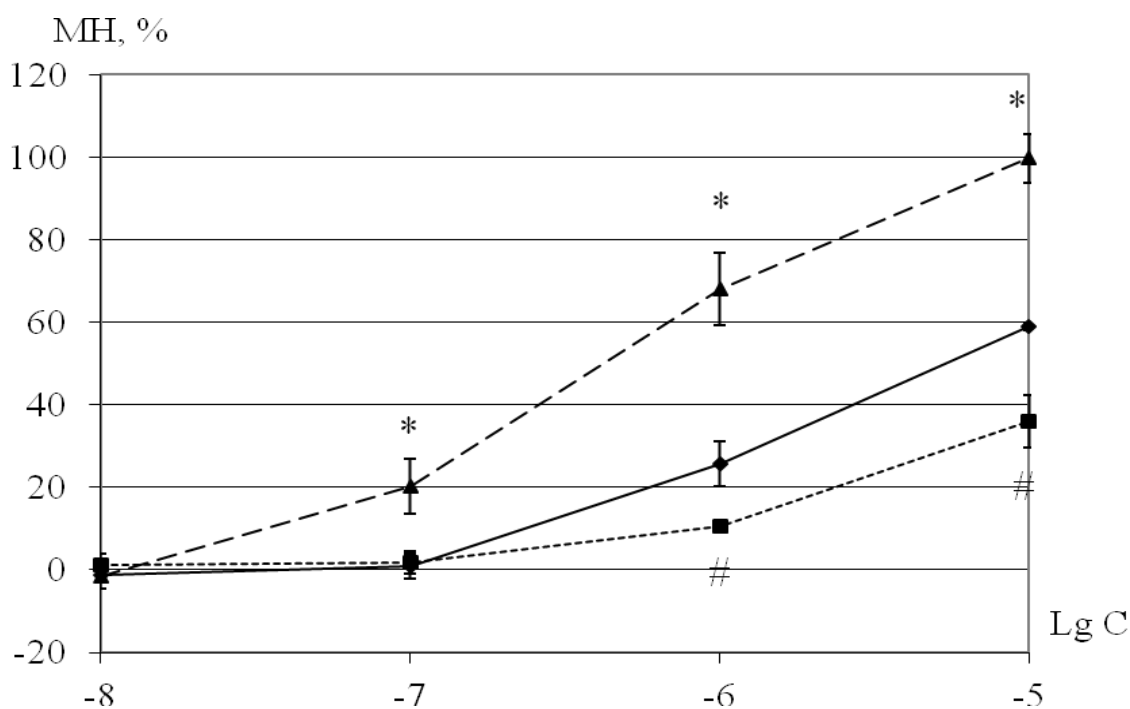


Рисунок 17. Зависимость механического напряжения интактных гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок от концентрации карбахолина

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %). По оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации карбахолина (Lg C).

Сплошная линия – интактные сегменты воздухоносных путей животных контрольной группы

Пунктирная линия – интактные сегменты воздухоносных путей обработанных наночастицами магнетита *in vitro*.

Мелкий пунктир – интактные сегменты воздухоносных путей обработанных наночастицами феррита кобальта *in vitro*

* – статистическая значимость различий величины амплитуд сократительных реакций сегментов воздухоносных путей животных контрольной группы и обработанных наночастицами магнетита, ($p < 0,05$),

– статистическая значимость различий величины амплитуд сократительных реакций сегментов воздухоносных путей животных контрольной группы и обработанных наночастицами феррита кобальта, ($p < 0,05$).

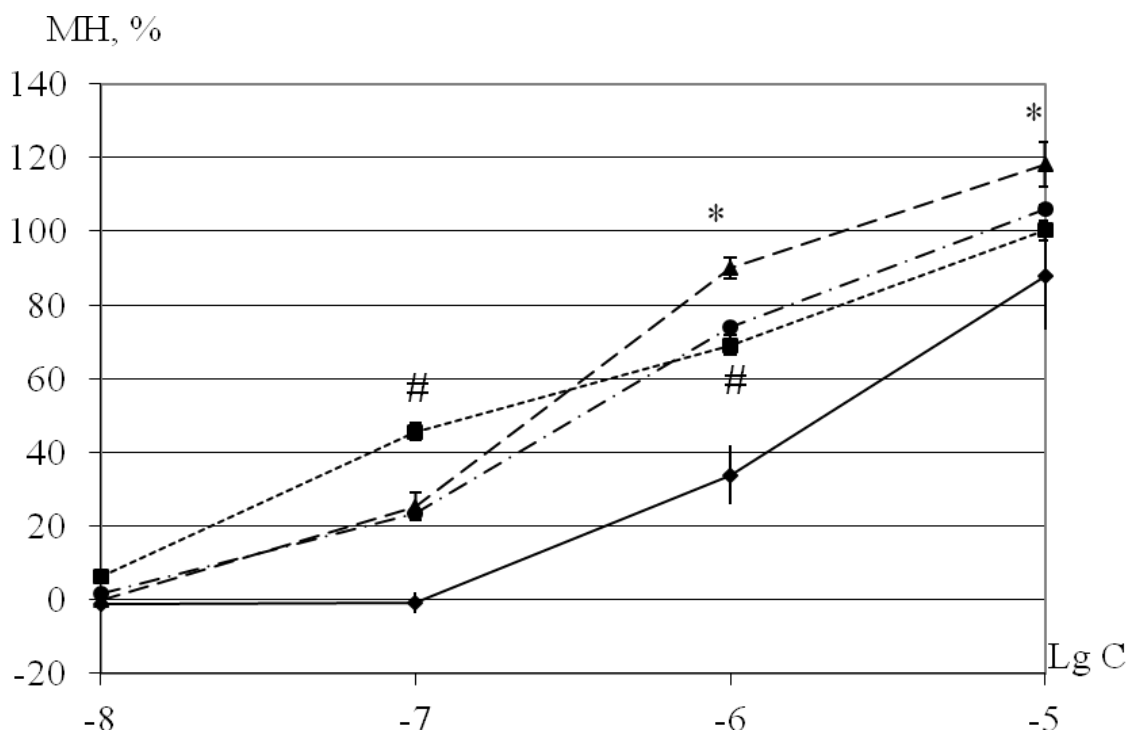


Рисунок 18. Зависимость механического напряжения деэпителизированных гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок от концентрации карбахолина

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %). По оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации карбахолина (Lg C).

Сплошная линия – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей животных контрольной группы

Пунктирная линия – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей обработанных наночастицами магнетита *in vitro*

Мелкий пунктир – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей обработанных наночастицами феррита кобальта *in vitro*.

Штрих-пунктир – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей животных обработанных наночастицами диоксида олова *in vitro*.

* – статистическая значимость различий величины амплитуд сократительных реакций сегментов воздухоносных путей контрольной группы и обработанных наночастицами магнетита *in vitro*, ($p < 0.05$),

– статистическая значимость различий величины амплитуд сократительных реакций сегментов воздухоносных путей контрольной группы и обработанных наночастицами феррита кобальта *in vitro*, ($p < 0.05$).

3.2.2. Особенности гистаминергической регуляции гладких мышц воздухоносных путей при действии наночастиц феррита кобальта, магнетита и диоксида олова *in vitro*

Предварительно определили концентрацию нанопорошков для обработки гладкомышечных сегментов – 0,3 мг/мл. Для оценки влияния взвеси нанодисперсных частиц на гистаминергические сократительные реакции воздухоносных путей морских свинок, в камеру с сегментами добавляли нанопорошки, время действия 15 минут, далее использовали гистамин в диапазоне концентраций 0,01 мкМ–10 мкМ. При аппликации гистамина сегменты воздухоносных путей отвечали дозозависимым сокращением.

Сравнивая величины механического напряжения сегментов группы контроля и сегментов обработанных нанопорошками, выяснили, что амплитуда сокращения интактных и деэпителизированных сегментов обработанных наночастицами CoFe_2O_4 была выше контрольной ($p < 0,05$) (рис. 19, 20). Амплитуды сокращения сегментов, обработанных магнетитом (интактные и деэпителизированные) и диоксидом олова (с удаленным эпителием) мало отличались от силы сокращения сегментов группы контроля. При этом величина амплитуды сокращения интактных сегментов, обработанных магнетитом, была ниже контрольной, тогда как во всех остальных случаях амплитуды сокращения изменялись в сторону увеличения.

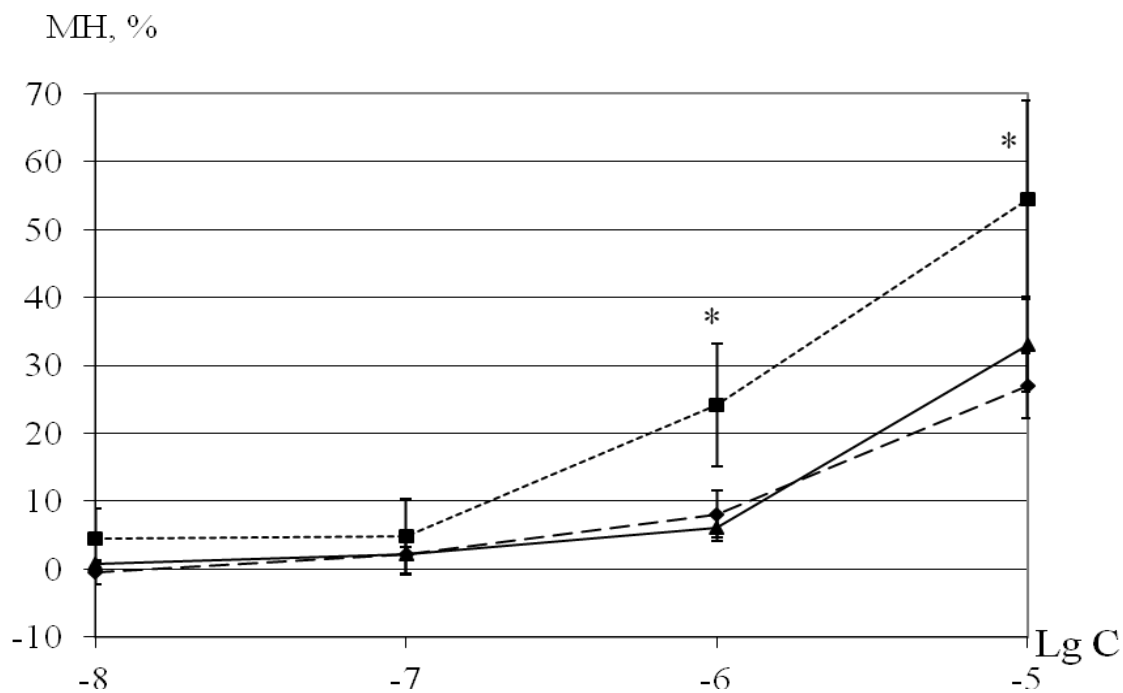


Рисунок 19. Зависимость механического напряжения интактных гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок от концентрации гистамина

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).

Сплошная линия – интактные сегменты воздухоносных путей животных контрольной группы

Пунктирная линия – интактные сегменты воздухоносных путей обработанных наночастицами магнетита *in vitro*.

Мелкий пунктир – интактные сегменты воздухоносных путей обработанных наночастицами феррита кобальта *in vitro*

* – статистическая значимость различий величины амплитуд сократительных реакций сегментов воздухоносных путей животных контрольной группы и обработанных наночастицами феррита кобальта *in vitro*, ($p < 0,05$).

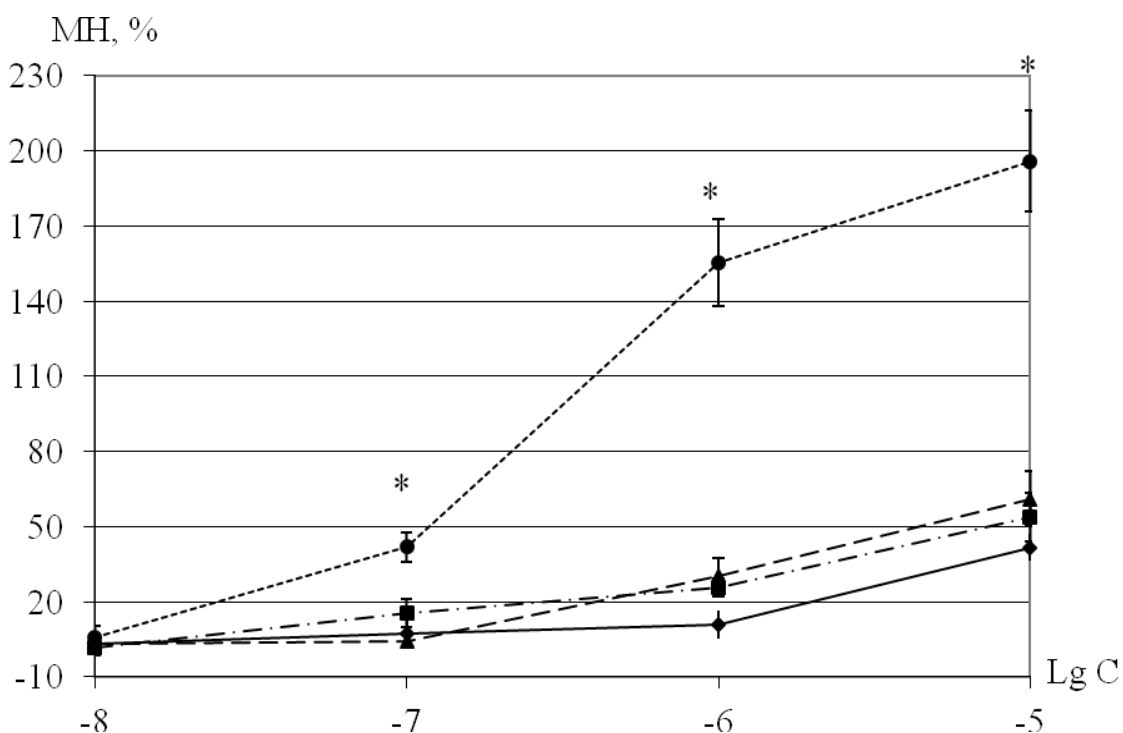


Рисунок 20. Зависимость механического напряжения деэпителизированных гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок от концентрации гистамина

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).

Сплошная линия – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей животных контрольной группы

Пунктирная линия – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей обработанных наночастицами магнетита *in vitro*

Мелкий пунктир – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей обработанных наночастицами феррита кобальта *in vitro*.

Штрих-пунктир – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей животных обработанных наночастицами диоксида олова *in vitro*.

* – статистическая значимость различий величины амплитуд сократительных реакций сегментов воздухоносных путей контрольной группы и обработанных наночастицами феррита кобальта *in vitro* ($p < 0,05$).

Снижение сократительной активности (по сравнению с контрольной группой) интактных сегментов, обработанных магнетитом и повышение при обработке ферритом кобальта, позволяет сделать предположение, что механизм действия или последствия взаимодействия ткани с наночастицами может зависеть от специфических свойств исследуемого материала, обусловленных химическим составом, что согласуется с результатами изучения влияния катионного заряда на цитотоксичность [143]. Возможно, присутствие различных ионов в составе наночастиц обуславливает скорость проникновения наноматериала через неповрежденный эпителий ВП, либо изменяется интенсивность наработки факторов расслабления в сторону увеличения или уменьшения в ответ на действие наноструктур различного состава.

Деэпителизированные сегменты, обработанные наночастицами магнетита и диоксида олова, имели малую величину различий амплитуды сокращений, при этом сегменты группы контроля развивали сократительный ответ меньшей силы. В тоже время, при действии феррита кобальта сокращение было значительно больше контрольного. Это так же может подтверждать зависимость биологического ответа от химического состава наноматериала. Повышение уровня сократительного ответа и снижение величины EC_{50} позволяет предполагать об увеличении биодоступности БАВ вследствие его взаимодействия с наночастицами в рабочем растворе и, увеличения адгезивных свойств, либо вследствие изменения структуры мембраны ГМК или ее компонент при действии наноматериала.

3.2.3. Особенности адренергической регуляции гладких мышц воздухоносных путей при взаимодействии с наноматериалом *in vitro*

Изучили влияние сальбутамола на механическое напряжение ГМ при условии предсокращения сегментов гиперкалиевым раствором Кребса. При исследовании ответов деэпителизированных сегментов морских свинок контрольной группы на действие сальбутамола было выявлено, что

дозозависимым расслаблением отвечали все сегменты. Это наблюдали при воздействии сальбутамола в диапазоне концентраций 0,1 мкМ–10 мкМ. Наибольшее расслабление отмечали при воздействии сальбутамола в концентрации 10 мкМ, величина механического напряжения составила $83,21 \pm 5,61\%$ от амплитуды предсокращения ($n=19$).

На воздействие сальбутамолом на сегменты ВП обработанные наночастицами *in vitro* так же наблюдали дозозависимое расслабление до $85,01 \pm 5,15\%$ – при обработке ферритом кобальта ($n=6$), $68,54,46 \pm 6,59\%$ – магнетитом ($n=5$), $92,46 \pm 0,78\%$ – диоксидом олова ($n=6$). Различия значений величины механического напряжения сегментов группы контроля и сегментов, обработанных нанопорошками не являлись статистически значимыми (рис. 21).

Более выраженное расслабление при добавлении наночастиц *in vitro*, но не превышающее по величине контрольное, может свидетельствовать о том, что снижение амплитуды реакции связано не только с изменением рецепторов (как при ингаляционном введении частиц), но и зависит от дополнительных факторов. Например, при одновременном нахождении в рабочем растворе БАВ и наночастиц возможно их взаимодействие, приводящее к снижению степени взаимодействия агониста с рецептором. Или вследствие отсутствия эпителия, наночастицы изменяют свойства рецепторов или других компонентов мембраны либо внутриклеточных структур ГМ, что и нарушает сокращение при действии БАВ. Увеличение амплитуды ответной реакции на действие сальбутамола при добавлении магнетита *in vitro* свидетельствует о его способности вызывать более выраженные изменения при контакте с биоматериалом и/или БАВ. Возможно, это обусловлено катионным зарядом либо иными свойствами наноразмерных частиц, связанных с химическим составом.

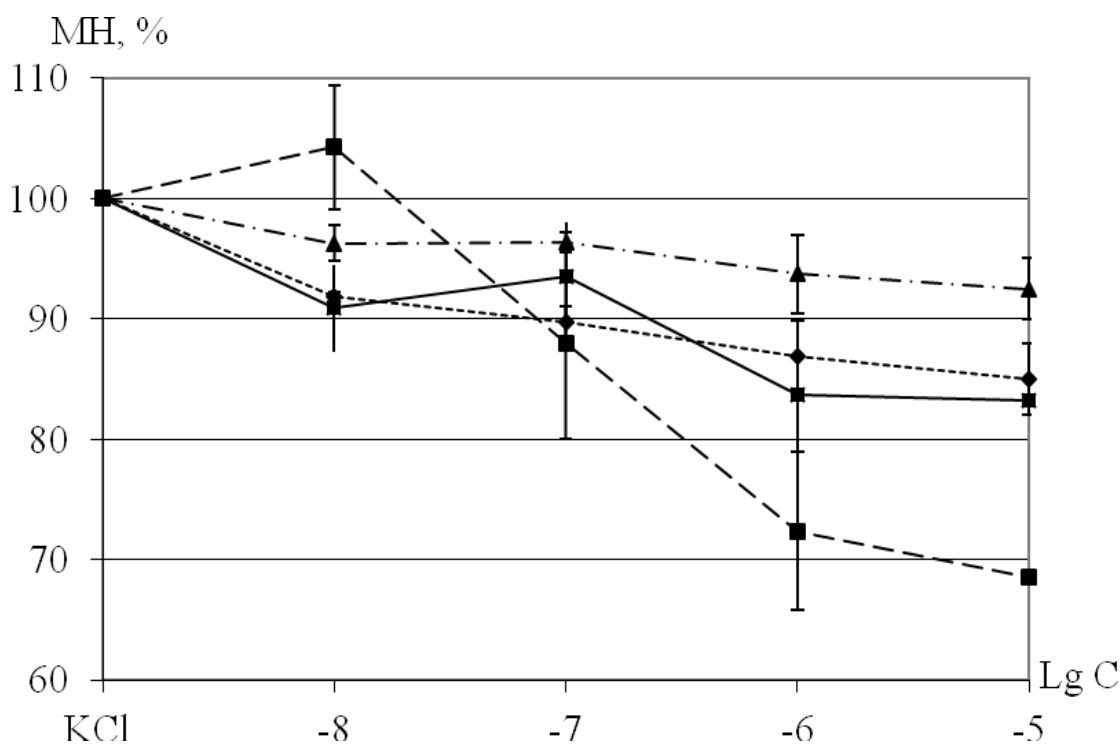


Рисунок 21. Зависимость механического напряжения дезэпителизированных гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, от концентрации сальбутамола.

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

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

Сплошная линия – дезэпителизированные сегменты воздухоносных путей животных контрольной группы

Пунктирная линия – дезэпителизированные сегменты воздухоносных путей обработанных наночастицами магнетита *in vitro*

Мелкий пунктир – дезэпителизированные сегменты воздухоносных путей обработанных наночастицами феррита кобальта *in vitro*.

Штрих-пунктир – дезэпителизированные сегменты воздухоносных путей животных обработанных наночастицами диоксида олова *in vitro*.

Изучили влияние сальбутамола на амплитуду расслабления ГМ на фоне предсокращения гистамином. Предсокращение проводили, используя гистамин в концентрациях, вызывающих полумаксимальное сокращение сегментов. Для сегментов контрольной группы и при обработке сегментов *in vitro* 7,7 мкМ, для сегментов обработанных наночастицами феррита кобальта – 4,4 мкМ, магнетита – 8,2 мкМ, диоксида олова – 6,9 мкМ.

Все исследуемые сегменты отвечали дозозависимым расслаблением по величине превосходящим амплитуду расслабления вызванную сальбутамолом при условии предсокращения сегментов гиперкалиевым раствором Кребса. Сегменты контрольной группы с удаленным эпителием, предсокращенные гистамином, в ответ на воздействие сальбутамола в концентрации 0,01 мкМ–10 мкМ отвечали дозозависимым расслаблением. Максимальная величина расслабления составила $-6,22 \pm 2,68\%$ ($EC_{50}=0,022$ мкМ, $n=10$) при действии сальбутамола в концентрации 10 мкМ. На воздействие сальбутамола при добавлении наноматериала *in vitro* амплитуда расслабления сегментов, обработанных магнетитом ($-7,94 \pm 2,73\%$ $EC_{50}=0,09 \cdot 10^{-2}$ мкМ, $n=4$) статистически значимо не отличалась от контрольной, а так же это значение сопоставимо с амплитудой расслабления сегментов полученных от животных ингалированных этим наноматериалом. Введение *in vitro* наночастиц феррита кобальта и диоксида олова напротив вызвало меньшее по амплитуде расслабление ГМ ($88,43 \pm 14,26\%$ $EC_{50}=0,023$ мкМ $n=12$ и $26,25 \pm 8,05\%$ $EC_{50}=0,001$ мкМ $n=3$ соответственно) по сравнению с контрольной группой, а так же амплитудой расслабления сегментов обработанных этими нанопорошками *in vivo* (рис.22). При этом величина EC_{50} была меньше при добавлении наночастиц *in vitro* для всех видов исследуемых материалов. Таким образом, при введении наночастиц *in vitro* наблюдали меньшую по величине реакцию расслабления, чем при ингаляционном способе. При этом величина EC_{50} в этом случае снижалась.

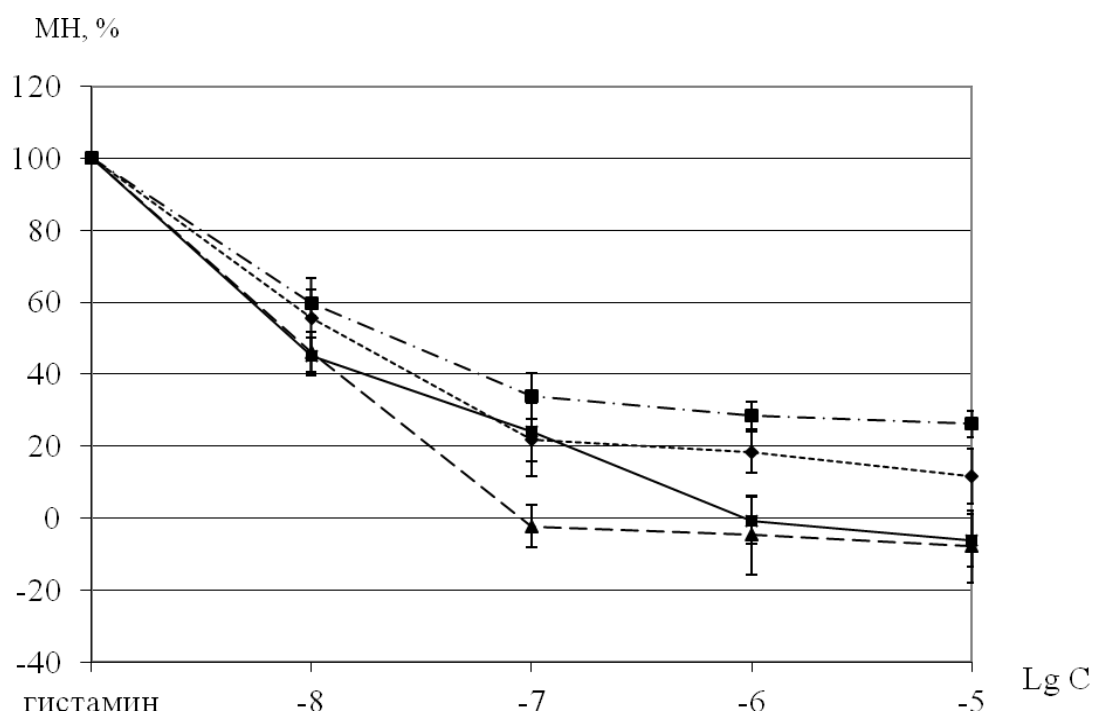


Рисунок 22. Зависимость механического напряжения деэпителизированных гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок, предсокращенных гистамином, от концентрации сальбутамола.

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

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

Сплошная линия – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей животных контрольной группы

Пунктирная линия – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей обработанных наночастицами магнетита *in vitro*

Мелкий пунктир – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей обработанных наночастицами феррита кобальта *in vitro*.

Штрих-пунктир – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей животных обработанных наночастицами диоксида олова *in vitro*.

Выяснили, что величина расслабления при действии сальбутамола зависит от вида предсокращающего агента. При использовании гистамина наблюдали более выраженное расслабление во всех сформированных экспериментальных и контрольных группах.

Полученные данные позволяют сделать предположение о том, что изменение механического напряжения может быть обусловлено способом введения наночастиц, их составом, возможности непосредственного взаимодействия с БАВ и предсокращающим агентом в рабочем растворе. Что и ведет к изменению сродства рецепторов к агонисту, возможно, изменению количества рецепторов, запускаемых эффекторных механизмов и как следствие изменению механического напряжения гладкомышечных сегментов.

3.3. Исследование роли эпителия воздухоносных путей на сократительные реакции гладких мышц в присутствии наноразмерных структур

3.3.1. Участие эпителия в холинергической регуляции сократительных реакций гладких мышц воздухоносных путей морских свинок

Для оценки влияния эпителия ВП на механическое напряжение ГМ сравнивали амплитуду сокращения интактных и деэпителизированных сегментов. Карбахолин в концентрации 1–10 мкМ вызывал дозозависимое сокращение интактных сегментов контрольной группы. Максимум амплитуды сокращения составил $58,93 \pm 0,97\%$ ($n=5$) и наблюдался при действии 10 мкМ карбахолина. При воздействии карбахолином на деэпителизированные сегменты контрольной группы наблюдали также дозозависимое сокращение сегментов при действии агониста в концентрации 1–10 мкМ. При этом максимальная амплитуда на воздействие 10 мкМ карбахолина была выше, чем у интактных сегментов и составила

87,74±14,3% (n=8). Данные различия являлись статистически значимыми (рис.23). Полученные результаты позволяют думать, что эпителий при холинергической стимуляции бронхов может оказывать регулирующее действие на сокращение гладких мышц путем усиления выработки релаксирующих факторов либо снижения констрикторных.

Деэпителизированные сегменты воздухоносных путей животных ингалированных нанопорошком феррита кобальта развивали механическое напряжение большее по амплитуде, чем интактные 115,49±6,42% (n=14) и 101,35±13,43% (n=6) соответственно. Различия не являлись статистически значимыми.

При действии карбахолина на сегменты воздухоносных путей животных ингалированных магнетитом, при удалении эпителия наблюдали более высокие значения амплитуды сокращения 131,04±6,21% (n=10), амплитуда сокращения сегментов при сохранном эпителии 121,16±6,21% (n=4). Различия величин механического напряжения (в условиях ингаляционного введения наночастиц) не являлись статистически значимыми.

Вероятно, подобные изменения могут быть вызваны снижением количества релаксирующего фактора, вырабатываемого эпителием воздухоносных путей. Возможно, это является следствием повреждения эпителия при ингаляции животных нанопорошком, или частичной потерей способности наработки факторов расслабления при данном воздействии.

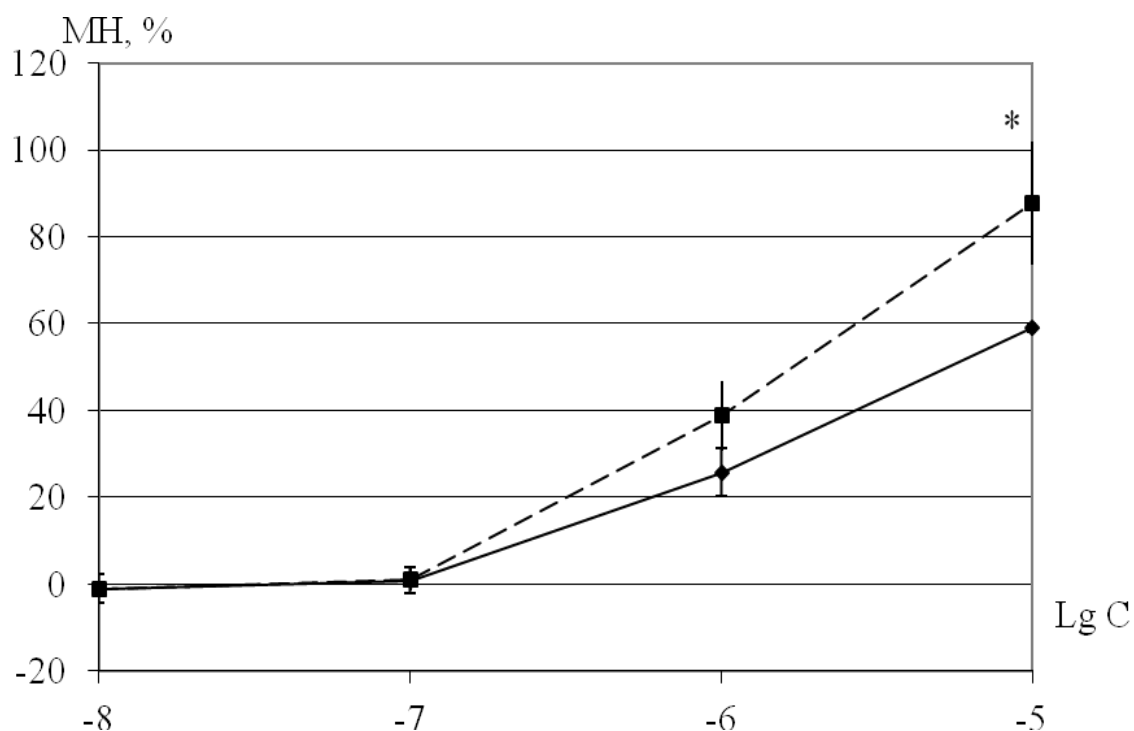


Рисунок 23. Зависимость механического напряжения интактных и деэпителизированных гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок от концентрации карбахолина

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

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

Сплошная линия – интактные сегменты воздухоносных путей

Пунктирная линия – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей

* – статистическая значимость различий величины амплитуд сократительных реакций интактных и деэпителизированных сегментов, ($p < 0,05$).

Для оценки *in vitro* влияния взвеси нанодисперсных частиц на холинергические сократительные реакции воздухоносных путей морских свинок, в камеру с сегментами добавляли эмульсию, содержащую нанопорошки (концентрация 0,3 мг/мл, время действия 15 минут), далее использовали карбахолин в диапазоне концентраций 0,01 мкМ–10 мкМ. На воздействие карбахолина сегменты отвечали дозозависимым сокращением.

Для оценки влияния эпителия ВП на механическое напряжение ГМ сравнивали амплитуду сокращения интактных и деэпителизированных сегментов, обработанных нанопорошками феррита кобальта и магнетита. В обоих случаях величина механического напряжения деэпителизированных сегментов превышала амплитуду сокращения интактных сегментов. При добавлении феррита кобальта $100,23 \pm 5,01\%$ (n=6) и $35,9 \pm 6,31\%$ (n=6) соответственно (рис.24), при добавлении магнетита $118,19 \pm 6,14\%$ (n=8) и $99,71 \pm 5,83\%$ (n=6) (рис.25). Данные различия являлись статистически значимыми ($p < 0,05$). В обоих случаях величина EC_{50} деэпителизированных сегментов была ниже, чем интактных сегментов.

На основании полученных данные можно предполагать о том, что холинергическая стимуляция воздухоносных путей может либо несколько увеличивать выработку эпителием релаксирующего фактора, либо снижать количество констрикторных факторов (например, таких как простагландины, лейкотриены, ацетилхолин) [98, 103]. В результате ингаляций нанопорошками эпителий практически полностью утрачивает эту способность, и сохраняет ее только при действии высоких концентраций карбахолина. Возможно, полученные результаты свидетельствуют о дисфункциях эпителия ВП и возможном нарушении рецепторного поля возникающих, например, вследствие изменения липидного состава мембран при эндоцитозе наноматериалов [43].

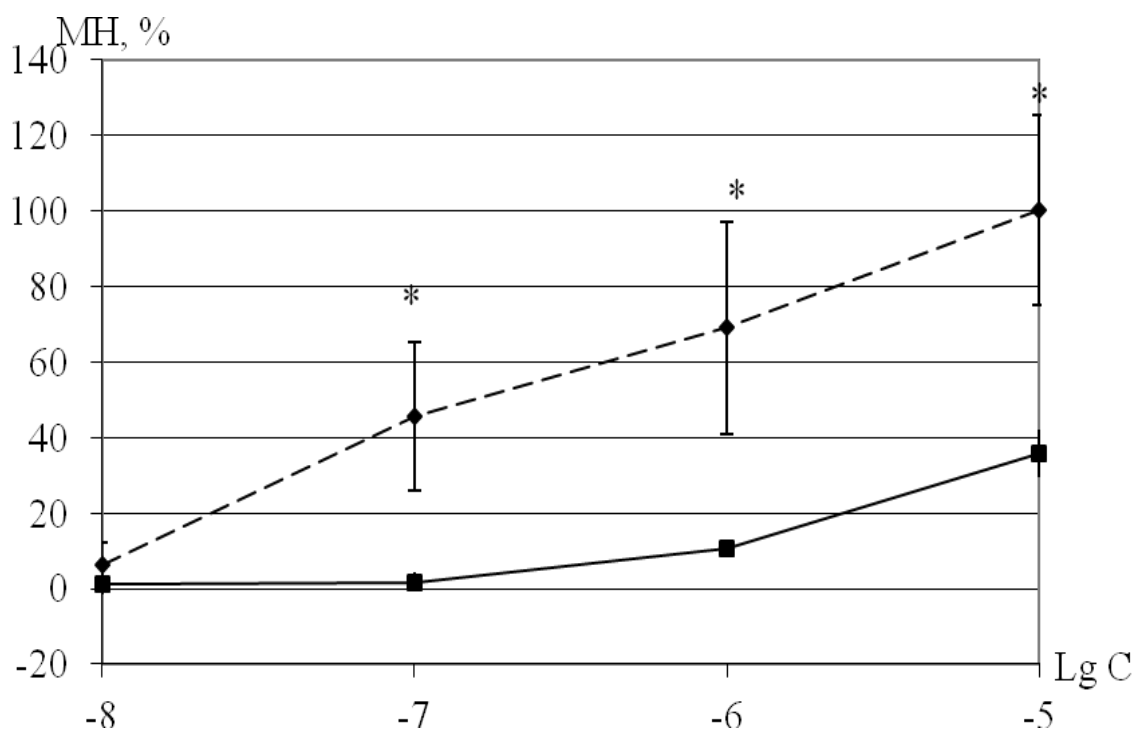


Рисунок 24. Зависимость механического напряжения интактных и деэпителизированных гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок, обработанных наночастицами феррита кобальта *in vitro*, от концентрации карбахолина

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

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

Сплошная линия – интактные сегменты воздухоносных путей

Пунктирная линия – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей.

* – статистическая значимость различий величины амплитуд сократительных реакций интактных и деэпителизированных сегментов, ($p < 0,05$).

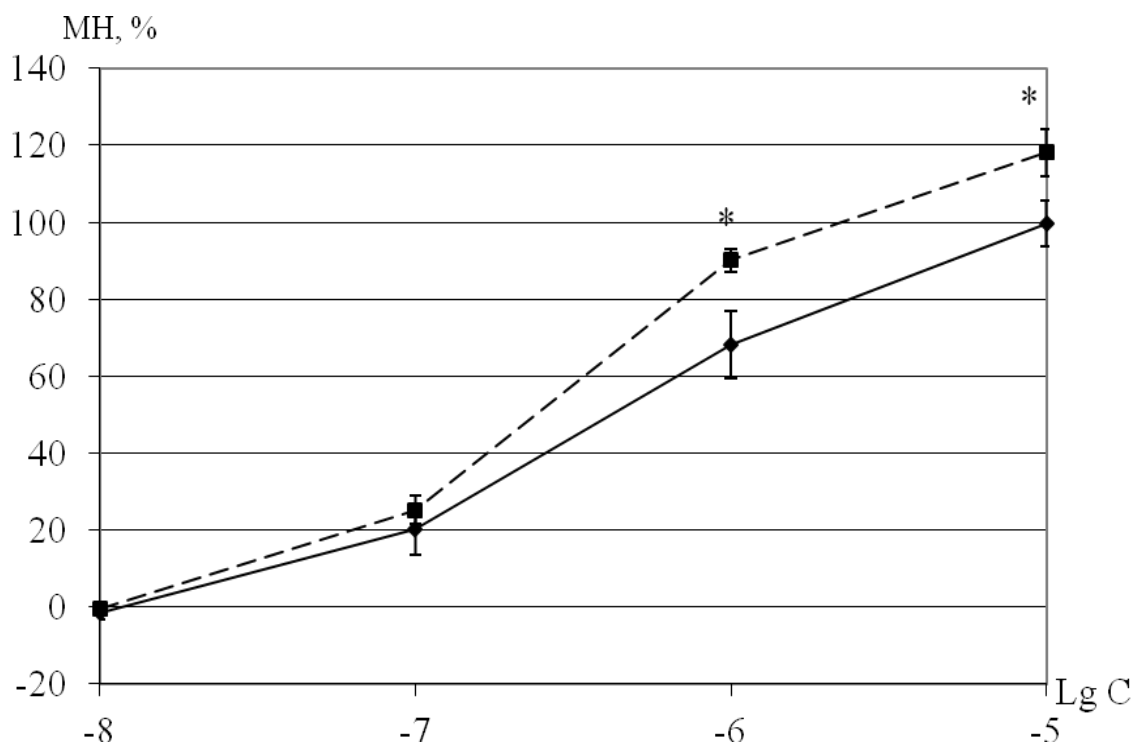


Рисунок 25. Зависимость механического напряжения интактных и деэпителизированных гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок, обработанных наночастицами магнетита *in vitro*, от концентрации карбахолина

Сплошная линия – интактные сегменты воздухоносных путей

Пунктирная линия – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей.

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

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

3.3.2. Участие эпителия в гистаминергической регуляции сократительных реакций гладких мышц воздухоносных путей

Изучали влияние гистамина на сократительную активность сегментов бронхов морских свинок контрольной группы, использовали гистамин в диапазоне концентраций 0,01 мкМ–10 мкМ. Сегменты всех групп отвечали на воздействие гистамина дозозависимым сокращением - в концентрациях 0,01 мкМ–10 мкМ (рис.26). Величина сокращения интактных сегментов на гистамин в концентрации 10 мкМ достигала $32,98 \pm 4,84\%$ (n=15), деэпителизированных $41,77 \pm 5,47\%$ (n=9), данные различия являлись статистически значимыми ($p < 0,05$).

Изменение амплитуды сокращения при сохранном и удаленном эпителии свидетельствует о наличии факторов модулирующих расслабление ГМК. В роли такого фактора может выступать оксид азота (NO), выработанный эпителием интактных сегментов. У человека блокирование бронхоспазма вызванного действием гистамина связывают с NO, при этом происходит расширение бронхов без участия адренергических/холинергических рецепторов [13]. Этим объясняется и повышение амплитуды сокращения при удалении эпителия.

Для оценки влияния эпителия на развитие сокращения ГМ сравнили величину интактных и деэпителизированных гладкомышечных сегментов ВП животных, ингалированных нанопорошком.

Сегменты, полученные от животных ингалированных нанопорошком феррита кобальта и магнетита, развивали дозозависимое сокращение при применении гистамина в диапазоне концентраций 0,1–10 мкМ. Максимальная амплитуда сокращения интактных сегментов составила $75,5 \pm 4,2\%$ (n=6), $EC_{50} = 2,64$ мкМ (при ингаляции ферритом кобальта) и $41,59 \pm 9,29\%$ (n=6) (при ингаляции магнетитом).

На протяжении всего диапазона исследуемых концентраций гистамина, величина механического напряжения развиваемого деэпителизированными

сегментами была несколько больше, максимальные величины составили $82,29 \pm 4,79\%$ $EC_{50} = 0,45$ мкМ (при ингаляции ферритом кобальта) и $48,41 \pm 6,44\%$ ($n=6$) (при ингаляции магнетитом). Различия величин сократительных ответов в обоих случаях не являлись статистически значимыми. Величина EC_{50} деэпителизированных сегментов была ниже по сравнению с интактными, при ингаляции ферритом кобальта эти различия были статистически значимыми ($p < 0,05$).

Минимальные различия в амплитуде сокращения интактных и деэпителизированных сегментов могут быть обусловлены повреждением эпителия воздухоносных путей при ингаляции животных аэрозолями, содержащими наночастицами.

Амплитуда сокращения деэпителизированных сегментов экспериментальных групп была не на много выше величины сокращения сегментов с сохраненным эпителием, данное различие не является статистически значимым. Вероятно, при ингаляции морских свинок наночастицами может происходить повреждение эпителия, либо снижаться продукция релаксирующих факторов, что и является возможной причиной снижения различий величин механического напряжения в присутствии эпителия и без него [46, 148].

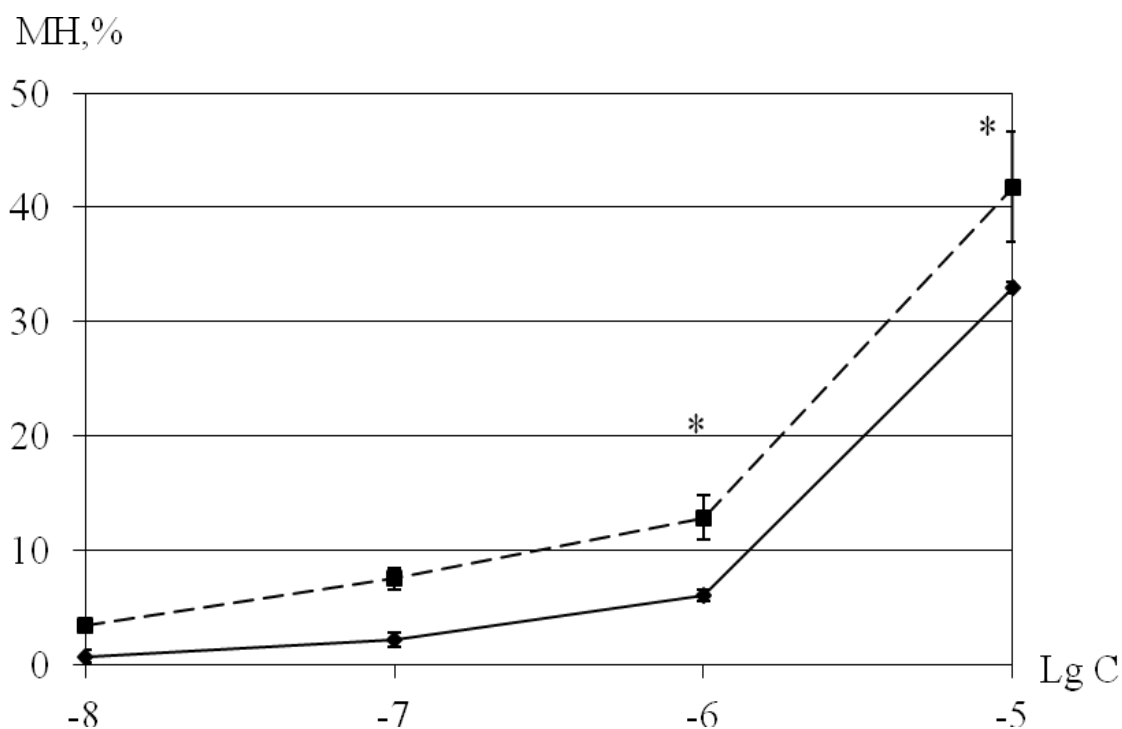


Рисунок 26. Зависимость механического напряжения интактных и деэпителизированных гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок контрольной группы от концентрации гистамина

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

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

Сплошная линия – интактные сегменты воздухоносных путей

Пунктирная линия – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей

* – статистическая значимость различий величины амплитуд сократительных реакций интактных и деэпителизированных сегментов воздухоносных путей ($p < 0,05$)

Для оценки *in vitro* влияния взвеси нанодисперсных частиц на гистаминергические сократительные реакции воздухоносных путей морских свинок, в камеру с сегментами добавляли нанопорошки 0,3 мг/мл, время действия 15 минут, далее использовали гистамин в концентрации 1 нМ–10 мкМ. На воздействие гистамина сегменты отвечали дозозависимым сокращением.

Для оценки влияния эпителия ВП на механическое напряжение ГМ сравнивали амплитуду сокращения интактных и деэпителизированных сегментов, обработанных нанопорошками феррита кобальта и магнетита. В обоих случаях величина механического напряжения деэпителизированных сегментов превышала амплитуду сокращения интактных сегментов 195,95±12,37% (n=9) и 54,54±12% (n=5) при добавлении феррита кобальта, 61,19±9,95% (n=7) и 26,96±4,79 % (n=6) при добавлении манетита. Данные различия являлись статистически значимыми (p<0,05) (рис. 27, 28).

Таким образом, при взаимодействии биологической ткани с нанопорошком *in vitro*, различия механического напряжения интактных и деэпителизированных сегментов, являются более выраженными по сравнению с изменениями, наблюдаемыми после ингаляционного введения наноматериала. Возможно, наночастицы введенные *in vivo* вызывают нарушение функционирования или целостности эпителия, что обуславливает малые корректирующие эффекты на величину механического напряжения. При действии нанопорошков на ГМК *in vitro* наличие эпителия оказывает значительное влияние на амплитуду развиваемого сокращения, возможно, вследствие сохранения структуры и способности выполнять барьерную функцию и обеспечивать модуляцию сокращения за счет наработки факторов расслабления.

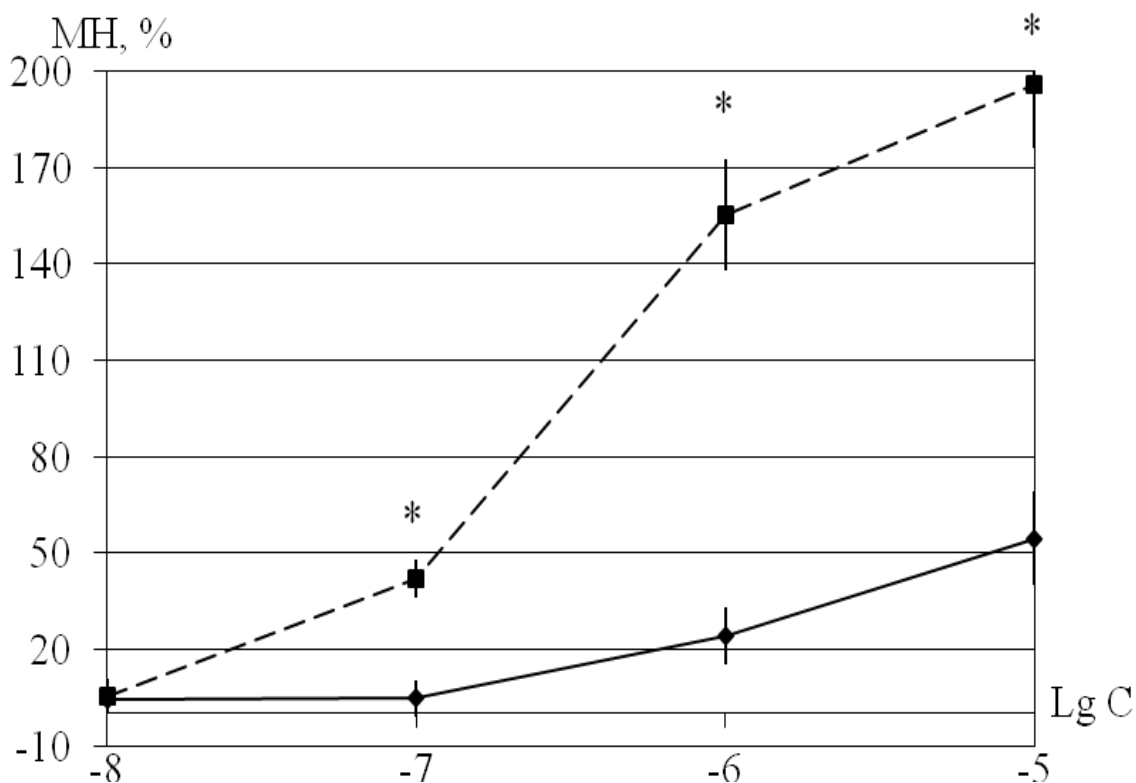


Рисунок 27. Зависимость механического напряжения интактных и деэпителизированных гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок, обработанных наночастицами феррита кобальта *in vitro*, от концентрации гистамина

Сплошная линия – интактные сегменты воздухоносных путей

Пунктирная линия – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей.

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).

* – статистическая значимость различий величины амплитуд сократительных реакций интактных и деэпителизированных сегментов, ($p < 0,05$).

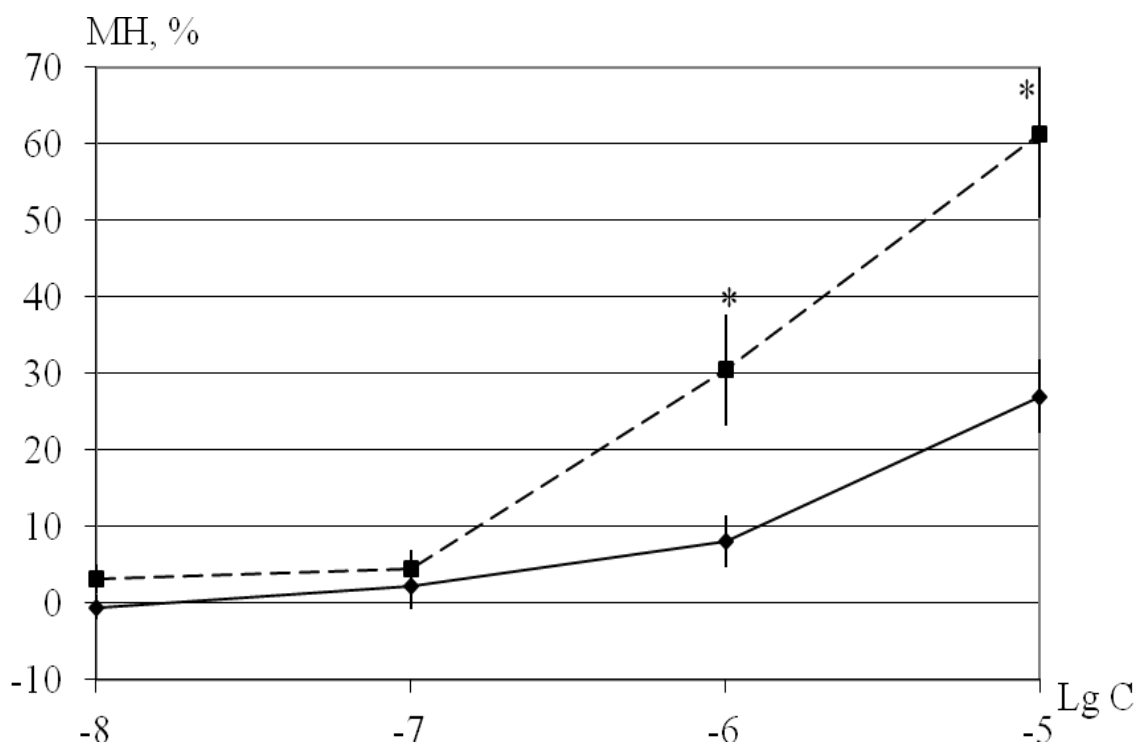


Рисунок 28. Зависимость механического напряжения интактных и деэпителизированных гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок, обработанных наночастицами магнетита *in vitro*, от концентрации гистамина

Сплошная линия – интактные сегменты воздухоносных путей

Пунктирная линия – деэпителизированные сегменты воздухоносных путей.

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).

* – статистическая значимость различий величины амплитуд сократительных реакций интактных и деэпителизированных сегментов, ($p < 0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Очевидно, что усилия производителей в области нанотехнологий, направленные на разработку новых способов получения продуктов питания, лекарственных препаратов, предметов народного потребления и т.д. и т.п. вызывают острую необходимость в понимании механизмов влияния наночастиц на клетки и ткани организма. Выступая в качестве барьера, кожа человека, кишечный тракт и лёгкие всегда находятся в прямом контакте с внешней средой, что делает возможным транспорт (пассивный и/или активный) различных субстанций, подобно воде, питательным веществам или кислороду. Являясь главными воротами для поступления наноматериалов с воздухом, трахея, бронхи и альвеолы обеспечивают их распространение через ткань легкого далее по всему организму.

По данным многочисленных исследований установлено, что наночастицы, благодаря своим уникальным характеристикам, могут влиять на состояние как самих воздухоносных путей, изменяя их сократительные свойства, так и на механизмы вне- и внутриклеточной сигнализации например: ансамбля эпителий-гладкомышечная клетка [33, 43, 51, 63, 83]. Данное предположение и подтверждается результатами настоящего исследования.

Известно, что тонус стенки воздухоносных путей обусловлен механическим напряжением гладкомышечных клеток, модулируемый различными физиологически активными веществами, выделяемыми нервными окончаниями, эпителиоцитами и клетками микроокружения. Само сокращение гладких мышц, которые являются внутренним слоем стенки бронхов и трахеи, развивается вследствие открывания потенциалозависимых кальциевых и/или рецепторуправляемых кальциевых каналов [11, 13, 16, 39]. Это подтверждают полученные в представленных исследованиях изменения механического напряжения сегментов воздухоносных путей под влиянием деполяризующего гиперкалиевого раствора и используемых биологически активных веществ (гистамин, карбахолин, сальбутамол).

Известно, что сорбция биополимеров на поверхности наночастиц, в том числе, и мембранных полимеров, вызывает конформационные изменения в молекулах ферментов, рецепторов, транспортеров и др., что сопровождается изменением их физиологической активности - от полной утраты до её потенцирования взаимодействием с наночастицами [43, 51, 63, 65, 74, 88, 111, 128]. Такие изменения могут изменять сократительные реакции гладких мышц воздухоносных путей в ответ на биологические активные вещества, что и подтвердили проведенные исследования.

С другой стороны, сорбция наноразмерных частиц на плазматической мембране может приводить к уменьшению эффективной площади, то есть мембранной поверхности, которая обеспечивает жизнедеятельность клетки (транспорт веществ, рецепторное взаимодействие с внеклеточными агонистами и др.) [74]. Это, в свою очередь, не может, не отразиться на поступлении в гладкомышечные клетки ионов кальция и регистрируемого уровня механического напряжения воздухоносных сегментов.

В настоящем исследовании убедительно показано, что введение наночасти *in vitro*, то есть непосредственно в рабочую камеру с сегментами воздухоносных путей, оказывает влияние на механизмы регуляции механического напряжения гладкомышечных клеток. Однако еще большее влияние наноразмерные частицы оказывают при попадании в организм экспериментальных животных ингаляционным путем. При таком способе введения наноматериал может оказывать не только прямое действие на гладкомышечные клетки, но и опосредованное. Наночастицы, попадающие в клетки микроокружения и эпителиоциты, могут приводить к увеличению или снижению выброса биологически активных соединений: цитокинов, эйкозаноидов, активных форм кислорода; что в конечном итоге приведет к изменению тонуса бронхов и трахеи.

Как показали эксперименты, введение наночастиц ингаляционно или *in vitro* приводит к потенцированию сократительных реакций на гистамин и карбахолин. При этом величина изменения механического напряжения

зависит как от вида используемого нанопорошка, так и от способа его введения.

Феррит кобальта вызывал наиболее значимое увеличение амплитуды сокращения на действие гистамина при обоих способах введения, сохранности или удалении эпителия.

Ингаляционное введение диоксида олова приводило к еще более выраженному увеличению сократительной реакции.

На действие карбахолина при всех сформированных условиях эксперимента более значимые изменения механического напряжения вызывал наноразмерный магнетит.

Так как плазматическая мембрана эпителиоцитов – первая структура, с которой сталкиваются ингаляционно введенные наночастицы, то очевидным представляется изменение функционирования клеток эпителия и модулирование механического напряжения прилежащих гладкомышечных клеток. Экспериментальные изучения находят много свидетельств того, что ингалированные наночастицы могут перемещаться по эпителию воздушного пространства и вызывать увеличение воспаления и высвобождение воспалительных маркеров, а так же частицы различных размеров могут быть подвергнуты эндоцитозу эпителиоцитами [33, 40, 43, 95, 116].

Проведенные исследования подтвердили, что именно при ингаляционном способе попадания наночастиц в организм происходит существенное снижение релаксирующего модулирующего влияния клеток эпителия на сократительные ответы изолированных сегментов воздухоносных путей.

Таким образом, можно заключить, что, несмотря на все положительные перспективы применения наночастиц в области промышленности, косметологии и особенно медицины, следует учитывать их способность вмешиваться в физиологические процессы регуляции сократительной активности гладких мышц воздухоносных путей и рекомендовать манипуляции, корректирующие функции эпителия.

ВЫВОДЫ

1. Ингаляционное введение наноразмерных частиц вызывает увеличение сократительных ответов гладких мышц воздухоносных путей на гистаминергические и холинергические воздействия.

2. Величина адренергического расслабления при ингаляционном введении наноразмерных частиц зависит от фактора, индуцирующего сокращение: возрастает на фоне предсокращения гистамином и уменьшается на фоне сокращения, вызванного гиперкалиевым раствором Кребса.

3. Изменение сократительных ответов гладких мышц сегментов воздухоносных путей на холин-, гистамин- и адренергические воздействия при действии наноразмерных частиц *in vitro* зависит от химической природы последних: при интакном эпителии феррит кобальта угнетает холинергические реакции. Тогда как магнетит угнетает гистаминергические реакции при интакном эпителии, но потенцирует адренергическое расслабление деэпителизированных гладкомышечных сегментов.

4. Сократительные ответы гладкомышечных сегментов на гистаминергические и холинергические воздействия угнетаются при сохранном эпителии воздухоносных путей. Указанный эффект эпителия сохраняется при обработке сегментов взвесью наноразмерных частиц *in vitro*, но подавляется при ингаляционном поступлении наноразмерных частиц.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю благодарность Агееву Борису Григорьевичу, с.н.с. ЛААС ИОА СО РАН за предоставленную возможность и помощь в исследовании пропускания лазерного излучения воздушно-аэрозольными смесями по стандартной спектрофотометрической схеме на стенде лаборатории и интерпритации полученных результатов.

Выражаю благодарность сотрудникам отдела структурной макрокинетики ТНЦ СО РАН за предоставленные наночастицы диоксида олова, феррита кобальта, магнетита.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абуева Р.М. Функциональное состояние холинергических и адренергических рецепторов у лиц с преастмой и факторами риска развития бронхиальной астмы: Дисс. ... канд. мед. наук / Р.М. Абуева. – М., 1989. – 133 с.
2. Арбузов Е.Н. Клиническая характеристика больных бронхиальной астмой, осложненной развитием астматического состояния / Е.Н. Арбузов, Д.А. Поташов // Патогенез, клиника и терапия экстрем. и терминальн. состояний / Омск. гос. мед. Ин -т. – Омск, 1994. – С. 120-122.
3. Баскаков М.Б. Механизмы регуляции функций гладких мышц вторичными посредниками / М.Б. Баскаков, М.А. Медведев, И.В. Ковалев и др. // Томск: Гавань. – 1996. – 154с.
4. Булыгина Е.В., Макаrchук В.В., Панфилов Ю.В., Оя Д.Р., Шахнов В.А. Наноразмерные структуры: классификация, формирование и исследование: учебное пособие для Вузов. / Е.В. Булыгина, В.В. Макаrchук, Ю.В. Панфилов, Д.Р. Оя, В.А. Шахнов // М.: САЙНС-ПРЕСС. – 2006. – 80с.
5. Бурый В.А. Роль внутриклеточного кальция в активации сокращения гладких мышц легочных артерий / В.А. Бурый, А.В. Гурковская, Н.И. Гокина, М.Ф. Шуба // Бюлл. эксперим. биол. и медицины. – 1989. – Т. 105, №9. – С. 261-264.
6. Васильев Ю.М. Клетка как архитектурное чудо. Ч. 2. Цитоскелет, способный чувствовать и помнить / Ю.М. Васильев // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 4. – С. 4-10.
7. Васильев Ю.М. Клетка как архитектурное чудо. Ч. 3. Клетка единая, но делимая / Ю.М. Васильев // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 8. – С. 18-23.
8. Венгеровский А.И. Лекции по фармакологии для врачей и провизоров. / А.И. Венгеровский //М.: Физико-математ. литература. – 2007. – 704с.

9. Гланц С. Медико-биологическая статистика: Пер. с англ. / С. Гланц // М.: "Практика". – 1999. - 459с.
10. Дьякова Е.Ю. Влияние интерлейкина-5 на адренергические реакции бронхов при модельной бронхиальной астме / Е.Ю. Дьякова, Т.Н. Зайцева, А.В. Носарев // Сборник статей по материалам VI конгресса молодых ученых и специалистов "Науки о человеке". – 2005. С. 73-74.
11. Дьячук Г.И. Возможные пути регуляции кальциевого обмена / Г.И. Дьячук // Физиол. журн. СССР. – 1991. – Т.77, № 11. – С. 117-125.
12. Зашихин А.Л. Развитие и ультраструктура нейромышечных контактов гладкой мышечной ткани бронхов / А.Л. Зашихин // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1989. – Т.97, № 7. – С. 58-63.
13. Капилевич Л.В. Внутриклеточные сигнальные системы в эпителий – и эндотелий-зависимых процессах расслабления гладких мышц / Л.В. Капилевич, И.В. Ковалев, М.Б. Баскаков и др. // Успехи физиологических наук. – 2001. – Т.32, №2. – С. 88-98.
14. Капилевич Л.В. Роль циклических нуклеотидов в регуляции тонуса легочных артерий кролика / Л.В. Капилевич, А.В. Носарев, И.В. Ковалёв и др // Бюл. экспер. биол. и мед. – 2003. – Т. 136, №6. – С. 610-612.
15. Курский М.Д. Транспорт кальция и функции гладких мышц / М.Д. Курский, Е.Т. Михайленко, А.Н. Федоров. – Киев : Наукова думка. – 1981. – 127с.
16. Левицкий Д.О. Кальций и биологические мембраны / Д.О. Левицкий – М.: Высш. школа, 1990. – 124с.
17. Магаева А.А. Механохимический синтез наноразмерных порошков на основе диоксида олова/ А.А. Магаева, О.Г. Терехова, В.И. Итин и др. //Журнал прикладной химии. - 2009. - Т.82. Вып.2. - С. 220-223.
18. Невзорова В.А. Окись азота и гемодинамика легких / В.А. Невзорова, Б.И. Гельцер // Пульмонология. – 1997. – №2. – С. 80-87.
19. Орлов С.Н. Кальмодулин / С.Н. Орлов. – М: Итоги науки и техники. – 1987. – 209с.

20. Орлов С.Н. Участие кальмодулина в регуляции электрического потенциала плазматической мембраны внутриклеточным кальцием / С.Н. Орлов, Г.М. Кравцов // Биохимия. – 1983. – Т. 48, № 9. – С. 1447-1455.
21. Расмуссен Г. Циркуляция кальция и внутриклеточная передача сигнала / Г. Расмуссен. – В мире науки. – 1989. – №12. – С. 36-43.
22. Реутов В.П. Физиологическое значение гуанилатциклазы и роль окиси азота и нитросоединений в регуляции активности этого фермента /В.П. Реутов, С.Н. Орлов // Физиология человека. – 1993. – Т. 19, № 1. – С. 124-137.
23. Сапин М.Р. Анатомия человека. Учеб. пособие для студ. биол. и мед. спец. вузов. Кн.2. / М.Р. Сапин, Г.Л. Билич // М.: Издательский дом ОНИКС: Альянс-В. – 1998. – 463с.
24. Скок В. И. Нервно-мышечная физиология / В.И. Скок, М.Ф. Шуба. // Киев: Вища школа. – 1986. – 224с.
25. Соловьев А.И. Ионные каналы как фармакологические мишени. Время смены парадигм классической фармакотерапии / А.И. Соловьев // Фармакология и лекарст. токсикология. – 2013. Т.36, №6. – С. 37-42.
26. Терехова О.Г. Механохимический синтез наноразмерных порошков ферритов из солевых систем/ О.Г. Терехова, В.И. Итин, А.А. Магаева и др. // Порошковая металлургия и функциональные покрытия. - 2008. – №1. – С. 45-50.
27. Химия твердого тела: монокристаллы, наноматериалы, нанотехнологии // IX Международная научная конференция. Кисловодск – Ставрополь: СевКавГТУ. - 2009. – 427 с.
28. Ходоров, Б.И. Роль хемовозбудимых кальциевых каналов в механизмах действия ацетилхолина, гистамина и брадикинина на деполяризованную гладкую мышцу / Б. И. Ходоров, Е. Н. Тимин, В. И. Погодаев // Физиология и биохимия медиаторных процессов. – М., 1976. – С. 133-134.

29. Шуба М.Ф. Мембранные механизмы возбуждения гладкомышечных клеток / М.Ф. Шуба, В.А Бурый // Физиол. ж. – 1984. – Т.30, N5. – С. 545-559.
30. Шуба М.Ф. Механизмы возбуждения и сокращения гладких мышц мозговых сосудов / М.Ф. Шуба, Н.И. Гокина. – Киев: Наукова думка. – 1991. – 129с.
31. Шуба М.Ф. Пути и механизмы трансмембранного входа в гладкомышечные клетки ионов кальция, участвующих в активации сокращения / М.Ф. Шуба // Физиологический журнал. – 1981. – Т.27, N4. – С. 533-541.
32. Шуленбург М. Наночастицы – крохотные вещества с огромным потенциалом. Возможности и риски / М. Суленбург. – Кёльн. Федеральное министерство образования и научных исследований (BMBWF) «Наноматериалы: новые вещества». – 2008. – С. 32-38.
33. Ahamed M. Nickel oxide nanoparticles exert cytotoxicity via oxidative stress and induce apoptotic response in human liver cells (HepG2) / M. Ahamed, D. Ali, H.A. Alhadlaq, et al. // Chemosphere. – 2013. – V.93, №10. – P.2514-2522.
34. Alioua A. PKG-1 phosphorylates the α -subunit and upregulates reconstituted GK Ca channels from tracheal smooth muscle / A. Alioua, J. P. Huggins, E. Rousseau // Amer. J. Physiol. – 1995. – V. 268, № 6. – P. 1057-1063.
35. Andre Nel Use of a Predictive Toxicological Approach and High Throughput Screening Nanomaterial Toxicity Testing in the 21st Century / Andre Nel, Tian Xia, Huan Meng, et al. // Acc. Chem. Res. – 2013. - V. 46, № 3. - P. 607-621.
36. Anfinogenova Y.J. Vascular smooth muscle contraction in hyperosmotic medium: role of Ca^{2+} , anion channels and cell volume-sensitive Na^{+} , K^{+} , Cl^{-} cotransport / Y.J. Anfinogenova, A.A Kilin, I.V.Kovalev et al. // J.Hypertens. - 2004. - P. 101.

37. Benham C.D. Do smooth muscle stimulants acting through different receptors open the some ion channels? / C.D. Benham, T.B. Bolton // Brit. J. Phisyol. - 1981 – V. 319. – P. 61.
38. Bermudez E. Pulmonary Responses of Mice, Rats, and Hamsters to Subchronic Inhalation of Ultrafine Titanium Dioxide Particles / E. Bermudez, B. M. James, A.W. Brian, et al. // Toxicological Sciences. – 2004. - V.77. - P.347-357.
39. Black J. The calcium dependents of histamine, carbochol and potassium chloride – induced contraction in human airways *in vitro* / J. Black, C. Armound, P. Jonson et al. // Eur. J. Pharmacol. – 1986. – V. 25. – P. 159-168.
40. Blank F. An optimized *in vitro* model of the respiratory tract wall to study particle cell interactions / F. Blank, B.M. Rothen-Rutishauser, S. Schuerch, P.Gehr // J. Aerosol. Med. – 2006. – V. 19. – P. 392-405.
41. Bowerfind W.M. Double-stranded RNA causes airway hyperreactivity and neuronal M2 muscarinic receptor dysfunction / W.M. Bowerfind, A.D. Fryer, D.B. Jacoby // J. Appl. Physiol. – 2002. – V. 92, № 4. – P. 1417-1422.
42. Brahler M. Magnetite-Loaded Carrier Erythrocytes as Contrast Agents For Magnetic Resonance Imaging / M.Brahler, R.Georgieva, N.Buske // Nanoletters. – 2006. – V. 6, №11. – P. 2505-2509.
43. Brandenberger C. Particles induce apical plasma membrane enlargement in epithelial lung cell line depending on particle surface area dose / C.Brandenberger, B.Rothen-Rutishauser, F. Blank et al. // Respir Res. – 2009. – V.10, № 1. – P. 22.
44. Brown D.M. Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles/ D.M. Brown, K. Donaldson, P.J. Borm, et al // Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol. – 2004. – V. 286. – P. 344-353.

45. Burgstaller G. Actin cytoskeleton remodelling via local inhibition of contractility at discrete microdomains / G. Burgstaller, M. Gimona // *J. Cell. Sci.* – 2004. – V. 117, № 2. – P. 223-231.
46. Busse W.W. Eosinophils in asthma / W.W. Busse, J.B. Sedgwick // *Ann. Allergy.* – 1992. – P. 286-290.
47. Cakici J. Epithelium dependent responses of serotonin in coaxial bioassay system / J. Cakici, B. Tunctan, N. Abacioglu et al. // *Eur. J. Pharmacol.* – 1993. – V. 236, № 1. – P. 97-105.
48. Castranova V. Signaling pathways controlling the production of inflammatory mediators in response to crystalline silica exposure: role of reactive oxygen/nitrogen species / V.Castranova // *Free Radic. Biol. Biol. Med.* – 2004. – V. 37. – P. 916-925.
49. Chan D.C.F. Synthesis and evaluation of colloidal magnetic iron-oxides for the site-specific radiofrequency-induced hyperthermia of cancer / D.C.F.Chan, D. Kirpotin, P.A. Bunn, et al. // *J. Magn. Mater.* – 1993. – V. 122. – P. 374-378.
50. Chen S. Temperature-Responsive Magnetite/PEO-PPO-PEO Block Copolymer Nanoparticles for Controlled Drug Targeting Delivery / S. Chen, Y. Li, C.Guo, et al. // *Langmuir.* – 2007. – V. 23. – P. 12669-12676.
51. Cheng M.D. Effects of nanophase materials (< or = 20 nm) on biological responses / M.D. Cheng // *J. Environ. Sci. Health. A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* – 2004. – V. 39, №10. – P.2691-2705.
52. Cohn L.A. Interactions between airway epithelium and mediators of inflammation / L.A. Cohn, K.B. Adler // *Exp. Lung. Res.* – 1992. – V. 18, №3. – P. 299–322.
53. Damron D.S. Role of PKC, tyrosine kinases, and Rho kinase in α -adrenoceptor-mediated PASM contraction / D.S. Damron, N. Kanaya, Y. Homma, S.O. Kim, et al // *Am.J.Physiol.Lung Cell.Mol.Physiol.* – 2002. – V.283. – P. L1051-L1064.

54. Desai A. Microtubule polymerization dynamics / A. Desai, T.J. Mitchison // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* – 1997. – V.13. – P. 831-117.
55. Diego A. H-7, a protein kinase inhibitor, inhibits spontaneous tone and spasmogenic responses in normal and sensitized guinea pig trachea / A. Diego, J. Cortijo, V. Villagrasa, et al. // *Gen. Pharmacol.* – 1995. – V. 26, №8. – P. 1747-1755.
56. Donaldson K. Inflammation caused by particles and fibers / K. Donaldson, T. Tran // *Inhal. Toxicol.* – 2002. – V.14. – P. 5-27.
57. Downes H. Comparison of drug responses *in vivo* and *in vitro* in airways of dogs with and without airway hyperresponsiveness / H. Downes // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1986. – V.237, №1. – P. 214-219.
58. Downing K.H. Nogales E. Tubulin and microtubule structure / K.H. Downing // *Curr. Opin. Cell. Biol.* – 1998. – V.10, №1. – P. 16-22.
59. Downing K.H. Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics / K.H. Downing // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* – 2000. – V.16. – P. 89-111.
60. Drake P. Gd-doped iron-oxide nanoparticles for tumor therapy via magnetic field hyperthermia / P. Drake, H.-J. Cho, P.-S. Shih, et al. // *J. Mater. Chem.* – 2007. – V.17. – P. 4914-4918.
61. Elder A. Translocation of Inhaled Ultrafine Manganese Oxide Particles to the Central Nervous System. / A. Elder, R. Gelein, V.Silva, et al. // *Environ Health Perspect.* – 2006. – V.114, №8. – P. 1172-1178.
62. Gan L.L. Trachea relaxing effects and beta2-selectivity of SPFF, a newly developed bronchodilating agent, in guinea pigs and rabbits / L.L. Gan, M.W. Wang, M.S. Cheng, et al. // *Biol. Pharm. Bull.* – 2003. – №3. – P. 323-328.
63. Geiser M. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells / M. Geiser, B. Rothen-Rutishauser, N. Kapp, et al. // *Environ Health Perspect.* – 2005. – V.113. – P. 1555-1560.

64. Gheshlaghi Z.N. Toxicity and interaction of titanium dioxide nanoparticles with microtubule protein / Z.N. Gheshlaghi, G.H. Riazi, S. Ahmadian, et al. // *Acta Biochim Biophys Sin.* – 2008. – V.40. – P. 777-782.
65. Gu H. Biofunctional magnetic nanoparticles for protein separation and pathogen detection / H. Gu, K. Xu, C. Xu, et al. // *J. of the American Chemical Society Chem. Commun.* – 2006. – P. 941-949.
66. Hardman J.G. Cyclic nucleotides and Blood Vessel Contraction / J.G. Hardman // *Handbook of Physiology, The Cardiovascular System, Vascular Smooth Muscle.* – 2011. – P. 249-252.
67. Hartshorne D.J. Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation / D. J. Hartshorne, M. Ito, F. Erdödi, et al. // *J. Muscle Res. Cell Motil.* – 1998. – V.19. – P.325-341.
68. Hartshorne D. Role of protein phosphatase type 1 in contractile functions: myosin phosphatase / D. Hartshorne, M. Ito, F. Erdodi, et al. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279, №36. – P. 37211-37214.
69. Hedwig M. Braakhuis Physicochemical characteristics of nanomaterials that affect pulmonary inflammation / Hedwig M. Braakhuis, Margriet Park, Ilse Gosens, et al. // *Part Fibre Toxicol.* – 2014. – P. 11-18.
70. Hee S. Park Attenuation of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of asthma by silver nanoparticles / Hee S.Park,Keun H. Kim, Sunhyae Jang et al. // *Int. J. Nanomedicine.* – 2010. – V. 5. – P. 505-515.
71. Hirao M. Regulation mechanism of ERM protein/plasma membrane association: Possible involvement of phosphatidylinositol turnover and rho-dependent signaling pathway / M. Hirao, N. Sato, T. Kondo, et al. // *J. Cell. Biol.* – 1996. – V. 135. – P. 37-52.
72. Hirota K. Effects of three different L-type Ca²⁺ entry blockers on airway constriction induced by muscarinic receptor stimulation / K. Hirota, E. Hashiba, H. Yoshioka, et al. // *Br. J. Anaesth.* – 2003. – V. 90, № 5. – P. 671-675.

73. Hoet Peter H.M. Nanoparticles – known and unknown health risks / H.M. Hoet Peter, I. Bruske-Hohlfeld, O.V. Salata // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2004. – P. 2-12.
74. Holeyvinsky K.O. Membrane capacitance changes associated with particle uptake during phagocytosis in macrophages / K.O. Holeyvinsky, D.J. Nelson // *Biophys. J.* – 1998. – V. 75. – P. 2577-2586.
75. Hong S. Interaction of Poly(amidoamine) Dendrimers with Supported Lipid Bilayers and Cells: Hole Formation and the Relation to Transport / S. Hong, A.U. Bielinska, A. Mecke, et al. // *Bioconjugate Chemistry*. – 2004. – V. 15. Iss. 4. – P.774-782.
76. Huang S.-H. Binding and Characterization of Lipase onto Magnetic Nanoparticles / S.-H. Huang, et al. // *Biotechnol. Prog.* – 2003. – Vol. 19. – P. 1095-1100.
77. Huang C. Y. Mechanisms activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase / C. Y. Huang, V. Chan, P. B. Chock, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1981. – V. 78. – P. 871-874.
78. Ichinose M. Histamine H₃-receptors inhibit cholinergic neurotransmission in guinea pig airways / M. Ichinose, C.D. Stretton, J.C. Schwartz, et al. // *Br. J. Pharmacol.* – 1989. – V. 97, № 1. – P. 13-15.
79. Ito Y. The roles of stored calcium in contractions of cat tracheal smooth muscle produced by electrical stimulation, acetylcholine and high K⁺ / Y. Ito // *Br. J. Pharm.* – 1984. – V. 29. – P. 667-676.
80. Ito M. Myosin phosphatase: structure, regulation and function / M. Ito, T. Nakano, F. Erdodi, D. J. Hartshorne // *Mol. Cell. Biochem.* – 2004. – V. 259 (1-2). – P. 197-209.
81. Jordan M.A. Microtubules as a target for anticancer drugs / M.A. Jordan, L. Wilson // *Nature Rev.* – 2004. – V. 4. – P. 253 - 265.
82. Kalambur V.S. Cellular Level Loading and heating of superparamagnetic iron oxide nanoparticles / V.S. Kalambur // *Langmuir*. – 2007. – V. 23. – P. 12329-12336.

83. Kang S.J. Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes / S.J. Kang // *Environmental Molecules Mutagens*. – 2008. – V. 49. Iss. 5. – P. 399 - 405.
84. Karaki H. Calcium release in smooth muscle / H. Karaki, B. Weiss // *Life sci*. – 1988. – V. 42, №2. – P. 111-122.
85. Kaura I.P. Potential of solid lipid nanoparticles in brain targeting / I.P. Kaura, R. Bhanarib, S. Bhanarib., V. Kakkara, et al. // *J. of Controlled Release*. – 2008. – V. 127. Iss. 2. – P. 97-109.
86. Kim D-H. *In vitro* & *in vivo* toxicity of CoFe₂O₄ nanoparticles for application to magnetic hyperthermia / D-H. Kim, K-M. Kim, K-N. Kim, et al. // *Nanotech*. – 2007. – V. 2. – P. 748-751.
87. Kim J.S. Multifunctional Nanoparticles Possessing A “Magnetic Motor Effect” for Drug or Gene Delivery / J.S. Kim, B.G. Kim, K.N. Yu, et al. // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2005. – V. 44. – P. 1068-1071.
88. Klaine S.J. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability and effects / S.J. Klaine, P.J.J. Alvarez, G.E. Batley, et al. // *Environ Toxicol Chem*. – 2008. – V. 27. – P. 1825-1851.
89. Klee C.B. Calmodulin / C.B. Klee, T.H. Crouch, P.G. Richman // *Am. J. Bichem*. – 1980. – V. 49. – P. 489-515.
90. Kohno S. Tonus of smooth muscles of isolated airway in siti / S. Kohno, K. Ohata // *Folia pharmacol. Japon.* - 1993. – V. 102, №1. – P. 1-10.
91. Konev S.V. Structural Lability of Biological Membranes / S.V. Konev. – Minsk : Nauka i Tekhnika. – 1987.
92. Korn E.D Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells / E.D. Korn // *Physiological Rev.* – 1982. – V. 62. – P. 672-737.
93. Korosec L. The role of respiratory epithelium and mast cell histamine in the reactivity of the mouse isolated trachea / L. Korosec, F. Erjavec // *Acta physiol. Scand.* - 1992. – V. 146, N 608. – P. 119.
94. Langer G. A. Calcium at the sarcolemma / G.A. Langer // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1984. – V. 16. – P. 147-153.

95. Limbach L.K. Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations / L.K. Limbach, Y. Li, R.N. Grass, et al. // *Environ. Sci. Technol.* – 2005. – V. 39, №23. – P. 9370-9376.
96. Lind K. A novel formulation for superparamagnetic iron oxide (SPIO) particles enhancing MR lymphography: comparison of physicochemical properties and the *in vivo* behavior / K. Lind, M. Kresse, N.P. Debus, et al. // *Drug Target.* – 2002. – V. 10, №3. – P. 221-230.
97. Long T.C. Nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons *in vitro* / T.C. Long, J. Tajuba, P. Sama, et al. // *Environ Health Perspect.* – 2007. – V. 115, №11. – P. 1631.
98. Moffatt J.D. Role of the epithelium and acetylcholine in mediating the contraction to 5-hydroxytryptamine in the mouse isolated trachea / J.D. Moffatt, T.M. Cocks, C.P. Page // *Br. J. Pharmacol.* – 2004. – V. 141, №7. – P. 1159-1166.
99. Morris C.E. Cell surface area regulation and membrane tension / C.E. Morris, U. Homann // *J. Membr. Biol.* – 2001. – V. 179. – P. 79-102.
100. Mu J.Y. The distribution of beta-adrenergic receptors in guinea pig lungs and their changes in experimental allergic asthma / J.Y. Mu, S. Bi // *Sci. China B.* – 1989. – V. 10. – P. 1208-1214.
101. Nagarjun Konduru Biokinetics and effects of barium sulfate nanoparticles / Nagarjun Konduru, Jana Keller, Lan Ma-Hock et al. // *Part. Fibre. Toxicol.* – 2014. – V. 10. – P. 1186.
102. Nakamura M. Actin filament disruption inhibits L-type Ca²⁺ channel current in cultured vascular smooth muscle cells / M. Nakamura, M. Sunagawa, T. Kosugi, N. Sperelakis // *Am. J. Physiol. Cell.* – 2000. – V. 279. – P. 480-487.
103. Ndukwu J.M. Immune sensitization augments epithelium dependent spontaneous tone in guinea pig trachealis / J.M. Ndukwu, J. Solway, K. Arbetter et al. // *Amer. J. Physiol.* - 1994. - № 5, Pt 1. - P. 2485-2492.

104. Nijkamp F.P. Nitric oxide and bronchial hyperresponsiveness / F.P. Nijkamp, G. Folkers // Arch. int. pharmacodyn. et ther. – 1995. – V. 329, №1. – P. 81-96.
105. Niwa Y. Inhalation exposure to carbon black induces inflammatory response in rats / Y. Niwa, Y. Hiura, H. Sawamura, et al. // Circ. J. – 2008. – V. 72, №1. – P. 144-149.
106. Oberdorster G. Association of particulate air pollution and acute mortality: involvement of ultrafine particles? / G. Oberdorster, R.M. Gelein, J. Ferin, et al. // Inhal. Toxicol. – 1995. – V. 7, №1. – P. 111-124.
107. Ohashi T. Dynamics and Elasticity of the Fibronectin Matrix in Living Cell Culture Visualized by Fibronectin - Green Fluorescent Protein / T. Ohashi, D. Kiehart, H. P. Erickson // Proc. Nat. Acad. Sci. – 1999. – V. 96. – P. 2153-2158.
108. Ohri T. Histamine N-methyltransferase controls the contractile response of guinea pig trachea of histamine / T. Ohri, K. Yamauchi, K. Sckizawa // J. Pharmacol. and Exp. Ther. – 1992. – V. 261, № 3. – P. 1268-1272.
109. Okon E. Biodegradation of magnetite dextran nanoparticles in the rat. A histologic and biophysical study / E. Okon, D. Pouliquen, P. Okon, et al. // Related Articles. – 1994. – V. 71, №6. – P. 895-903.
110. Orr G. Syndecan-1 mediates the coupling of positively charged submicrometer amorphous silica particles with actin filaments across the alveolar epithelial cell membrane / G. Orr, D.J. Panther, K.J. Cassens, et al. // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2009. – V. 236, №2. – P. 210-220.
111. Orr G. Submicrometer and nanoscale inorganic particles exploit the actin machinery to be propelled along microvilli-like structures into alveolar cells / G. Orr, D.J. Panther, J.L. Phillips, et al. // ACS Nano. – 2007. – V. 1, №5. – P. 463-475.
112. Papakonstanti E.A. Actin cytoskeleton: a signaling sensor in cell volume regulation / E.A. Papakonstanti, E.A. Vardaki, C. Stournaras // Cell. Physiol. Biochem. – 2000. – V. 10. – P. 257-264.

113. Park J. Interaction of nanoparticles with lipid layers. / J. Park, W. Lu // Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft. Matter. Phys. – 2009. – V. 80, №2.
114. Paul R.J. Effects of microtubule disruption on force, velocity, stiffness and $[Ca^{2+}]_i$ in porcine coronary arteries / R.J. Paul, P.S. Bowman, M.S. Kolodney // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2000. – V. 279, №5. – P. 2493-2501.
115. Pulskamp K. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants / K. Pulskamp, S. Diabaté, H.F. Krug // Toxicol. Lett. – 2007. – V. 168 – P. 58-74.
116. Qiang Y. Iron/iron oxide core-shell nanoclusters for biomedical applications / Y. Qiang, J. Antony, A. Sharma, et al // Journal of Nanoparticle Research. – 2006. – V. 8. – P. 489-496.
117. Richard W. C. Antigen-induced hyperreactivity to histamine: role of the vagus nerves and eosinophils / W.C. Richard, M.E. Christopher, L. Y. Bethany, et al. // Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. – 1999. – V. 276, № 5. – P. 709-714.
118. Rothen-Rutishauser B. Translocation of particles and inflammatory responses after exposure to fine particles and nanoparticles in an epithelial airway mod / B. Rothen-Rutishauser, C. Mühlfeld, F. Blank, et al. // Part. Fibre. Toxicol. – 2007. – P. 4-9.
119. Roux E. Role of sarcoplasmic reticulum and mitochondria in Ca^{2+} removal in airway myocytes / E. Roux, M. Marhl // Biophys. J. – 2004. – V. 86, № 4. – P. 2583-2595.
120. Sadeghi H. G. Guinea pig tracheal responsiveness *in vitro* role of nitric oxide/cyclic GMP pathway / H.G. Sadeghi, G. Folkerts, P. Henricks, et al. // Pharm. World and Sci. Suppl. J. – 1993. – V. 15, №6. – P. 10.
121. Scheid C. R. Mechanism of b-adrenergic relaxation of smooth muscle / C.R. Scheid, T.W. Honeyman, F.S. Fay // Nature. – 1979. – V. 277. – P. 32-36.
122. Shaw L. Inhibitors of actin filament polymerisation attenuate force but not global intracellular calcium in isolated pressurised resistance arteries / L. Shaw,

- S. Ahmed, C. Austin, M.J. Taggart // *J. Vasc Res.* – 2003. – V. 40, №1. – P.1-10.
123. Singh A.K. Interaction of polycations with cell surface negative charges of epithelial cells / A.K. Singh, B.S. Kasinath, E.G. Lewis // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1992. – V. 1120 – P. 337-342.
124. Skumiel A. Suitability of water based magnetic fluid with CoFe_2O_4 particles in hyperthermia / A. Skumie // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* – 2006. – V. 307. – P. 85-90.
125. Soenen S.J. High Intracellular Iron Oxide Nanoparticle Concentrations Affect Cellular Cytoskeleton and Focal Adhesion Kinase-Mediated Signaling / S.J. Soenen, N. Nuytten, S.F. De Meyer // *Small.* – 2010. – V. 9, №6 – P. 832-842.
126. Song Y. Exposure to nanoparticles is related to pleural effusion, pulmonary fibrosis and granuloma / Y. Song, X. Li, X. Du // *Eur. Respir. J.* – 2009. – V. 34, №3. – P. 559-567.
127. Springall D.R. Nitric oxide synthase in asthmatic human lung / D.R. Springall, Q.A. Hamid, L.K. Buttery et al. // *J. Pathol.* – 1993. – V. 169. – P. 153.
128. Stone V. Air pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: cellular and molecular interactions / V. Stone, H. Johnston, M.J. Clift // *IEEE Trans Nanobioscience.* – 2007. – V. 6, №4. – P. 331-340.
129. Takeuchi K. Perturbation of cell adhesion and microvilli formation by antisense oligonucleotides to ERM family members / K. Takeuchi, N. Sato, H. Kasahara, et al. // *J. Cell Biol.* – 1994. – V. 125. – P. 1371-1384.
130. Xia T. Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties / T. Xia, M. Kovochich, M. Liong, et al. // *ACS Nano.* – 2008. – V. 2, №10. – P. 2121-2134.

131. Tohda Y. Role of muscarinic acetylcholine receptors in a guinea pig model of asthma / Y. Tohda, R. Haraguchi, M. Itoh, et al. // *Int. Immunopharmacol.* – 2002. – V. 2, №11. – P. 1521-1527.
132. Torphy Th. Differential effects of methacholine and leukotriene D on cyclic nucleotide content and isoproterenol-induced relaxation in the opossum trachea / Th. Torphy // *J. Pharmacol. exp. Ther.* – 1986. – V. 237, №1. – P. 332-340.
133. Valen G. Hydrogen peroxide induces endothelial cell atypia and cytoskeleton depolymerization / G. Valen, A.Sonden, J. Vaage. // *Free Radical Biology and Medicine.* – 1999. – V. 26, №. 11. – P. 1480-1488.
134. Valiron O. Microtubule dynamics. / O. Valiron, N. Caudron, D. Job // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2001. – V. 58. – P. 2069-2084.
135. Vlahakis N.E. Deformation-induced lipid trafficking in alveolar epithelial cells / N.E. Vlahakis, M.A. Schroeder, R.E. Pagano, et al. // *J.Physiol.Lung.Cell.Mol.Physiol.* – 2001. – V. 280. – P. 938-946.
136. Wang J. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration / J. Wang, G. Zhou, C. Chen, et al. // *Toxicol. Lett.* – 2007. – V 168. – P. 176-185.
137. Warheit D.B. Pulmonary Instillation Studies with Nanoscale TiO₂ Rods and Dots in Rats: Toxicity Is not Dependent upon Particle Size and Surface Area / D.B. Warheit, T.R. Webb, C.M. Sayes, et al. // *Toxicological Sciences.* – 2006. – V. 91, № 1. – P. 227-236.
138. Warheit D.B. Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine-quartz particles in rats: toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics. / D.B. Warheit, T.R. Webb, V.L. Colvin, et al. // *Toxicol. Sci.* – 2007. – V. 95, №1. – P. 270-280.
139. Warheit D.B. Comparative Pulmonary Toxicity Assessment of Single-Wall Carbon Nanotubes in Rats / D.B. Warheit et al. // *Toxicological Sciences* – 2004. – V. 77. – P. 117-125.

140. Wu Wei-Te Effect of Nanoparticles Exposure on Fractional Exhaled Nitric Oxide (FENO) in Workers Exposed to Nanomaterials / Wei-Te Wu, Hui-Yi Liao, Yu-Teh Chung // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – V. 15, № 1. – P. 878-894.
141. Wittmaack K. In Search of the Most Relevant Parameter for Quantifying Lung Inflammatory Response to Nanoparticle Exposure: Particle Number, Surface Area, or What? / K. Wittmaack // *Environ Health Perspect.* 2007. – V. 115, № 2. – P. 187-194.
142. Worth N.F. Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins / N.F. Worth, B.E. Rolfe, J. Song, G.R. Campbell // *Cell Motil. Cytoskeleton.* – 2001. – V. 49, № 3. – P. 130-145.
143. Xiaoke Hua *In vitro* evaluation of cytotoxicity of engineered metal oxide nanoparticles / Xiaoke Hua, Sean Cooka, Peng Wang // *Science of The Total Environment.* – 2009.– V. 407, №8. – P.3070-3072.
144. Yamaguchi H. Isoproterinol increases peripheral $[Ca^{2+}]$ and decreases inner $[Ca^{2+}]$ in single airway smooth muscle cells / H. Yamaguchi, I. Kajita, J. M. Madison // *Amer. J. Physiol.* – 1995. – V. 268, № 3, Pt. 1. – P. 771-779.
145. Zhang C. Silica- and alokoxysilane-coated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles: a promising tool to label cells for magnetic resonance imaging / C. Zhang, B. Wangler, B. Morgenstern, et al. // *Langmuir.* – 2007. – № 23. – P. 1427-1434.
146. Zhang Y. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake / Y. Zhang, N. Kohler, M. Zhang // *Biomaterials.* – 2002. – V. 23. – P. 1553-1561.
147. Zhu M.-T. Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats / M.-T. Zhu, W.Y. Feng, B. Wang, et al. // *Toxicology.* – 2008. – V. 247, № 2-3. – P.102-111.
148. Zou J. Microarray profile of differentially expressed genes in a monkey model of allergic asthma / J. Zou, S. Young, F. Zhu et al. // *BioMed. Central Ltd Genome Biol.* – 2002. – № 3. – P. 1-13.