

БИОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

Наталья Петровна Бгатова – д.б.н., профессор, заведующая лабораторией ультраструктурных исследований, Федеральное государственное бюджетное учреждение «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» СО РАМН, г. Новосибирск
Nataliya P. Bgatova – Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Laboratory Ultrastructural Researches, Federal State Budgetary Institution «Scientific Institution of Clinical and Experimental Lymphology» Siberian Branch Russian Academy of Medical Sciences

Ольга Петровна Макарова – д.б.н., в.н.с. лаборатории ультраструктурных исследований, Федеральное государственное бюджетное учреждение «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» СО РАМН, г. Новосибирск
Olga P. Makarova – Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher of Laboratory of Ultrastructural Researches, Federal State Budgetary Institution «Scientific Institution of Clinical and Experimental Lymphology» Siberian Branch Russian Academy of Medical Sciences

Анастасия Алексеевна Пожидаева – м.н.с. лаборатории ультраструктурных исследований, Федеральное государственное бюджетное учреждение «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» СО РАМН, г. Новосибирск
Anastasiya A. Pozhidayeva – Junior Researcher of Laboratory of Ultrastructural Researches, Federal State Budgetary Institution «Scientific Institution of Clinical and Experimental Lymphology» Siberian Branch Russian Academy of Medical Sciences

Юрий Иванович Бородин – д.м.н., профессор, академик РАМН, директор Центра Эндокологической реабилитации, Федеральное государственное бюджетное учреждение «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» СО РАМН, г. Новосибирск
Yurii I. Borodin – Doctor of Biological Sciences, Professor, Academician of Russian Academy of Medical Sciences, Head of the Center of Endoecological Rehabilitation, Federal State Budgetary Institution «Scientific Institution of Clinical and Experimental Lymphology» Siberian Branch Russian Academy of Medical Sciences

Любовь Никифоровна Рачковская – к.х.н., заведующая лабораторией биологически активных соединений, Федеральное государственное бюджетное учреждение «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» СО РАМН, г. Новосибирск
Lubov N. Rachkovskaya – PhD, Head of the Laboratory of Biological Active Compounds, Federal State Budgetary Institution «Scientific Institution of Clinical and Experimental Lymphology» Siberian Branch Russian Academy of Medical Sciences

Владимир Иосифович Коненков – д.м.н., профессор, академик РАМН, директор Федеральное государственное бюджетное учреждение «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» СО РАМН
Vladimir I. Konenkov – Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of Russian Academy of Medical Sciences, Head of the Federal State Budgetary Institution «Scientific Institution of Clinical and Experimental Lymphology» Siberian Branch Russian Academy of Medical Sciences

УДК 546.55/.59. 616-01/09. 577.151.63

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ ЛИТИЯ

BIOLOGICAL EFFECTS OF NANO-SIZE LITHIUM PARTICLES

Методами световой, электронной микроскопии и биохимии выявлены биологические эффекты наноразмерных частиц карбоната лития при их введении интактным мышам линии СВА. Показано, что при внутримышечном введении наноразмерных частиц карбоната лития происходит усиление активности процессов перекисного окисления липидов в мышечной ткани бедра, что приводит к некрозу тканей в месте введения с последующим развитием регенераторных процессов на фоне ангиогенеза. Наноразмерные частицы карбоната лития накапливаются в разрушенных мышечных волокнах, фагосомах макрофагов мышечной ткани бедра и фагосомах гепатоцитов. После одно- и пятикратного введения наноразмерных частиц карбоната лития в мышечной ткани бедра происходит активация анаэробного гликолиза, о чем свидетельствует накопление молочной кислоты. После однократного введения наноразмерных частиц карбоната лития регистрировали гидролиз триглицеридов, поскольку их уровень в мышечной ткани снижался вчетверо, а после четырех и пятикратного отмечали накопление этих липидов. Введение наноразмерных частиц карбоната лития вызывает системные изменения метаболизма: способствует повышенной утилизации молочной кислоты в печени с образованием глюкозы и с последующим использованием ее в синтезе гликогена и триглицеридов. Введение наноразмерных частиц карбоната лития внутримышечно не вызывает значительного повреждения печени, о чем свидетельствует отсутствие достоверного повышения уровней продуктов липопероксидации и активности аргиназы, участвующей в цикле утилизации продуктов распада тканевых белков.

Ключевые слова: **наноразмерные частицы карбоната лития, аккумуляция, перекисное окисление липидов, некроз, гликолиз.**

Biological effects nano-size particles of lithium carbonate on intact CBA line mice were evaluated by methods of light, electron microscopy and biochemistry. It is shown that intramuscular injection of nano-sized nanoparticles of lithium carbonate increased activity of lipid peroxidation in muscle thigh, resulting tissue necrosis at the site of the subsequent development of regenerative processes and angiogenesis. Nano-size particles of lithium carbonate accumulated in damaged muscle fibers, muscle tissue macrophage phagosomes hip and phagosome hepatocytes. After one and five-fold injection of nano-sized particles of lithium carbonate in the thigh muscle anaerobic glycolysis is activated. As it is evidenced by the accumulation of lactic acid. Hydrolysis of triglycerides was registered after single injection of nano-sized of lithium carbonate particles, the levels of these lipids in muscular tissue decreased in four times and accumulation of these lipids was noted after the 4 and 5-fold unection of nano-sized particles. Injection of nano-sized of lithium carbonate particles caused system metabolic changes: provides increased utilization of lactic acid in the liver into glucose and then usts it in the synthesis of glycogen and triglycerides. Intramuscular injection of nano-sized lithium carbonate particles didn't cause significant damage to the liver. It is evidenced by the lack of significant increase in the levels of lipid peroxidation products and activity of arginase involved in the disposal cycle of decay products of tissue proteins.

Key words: **nano-size particles of lithium carbonate, accumulation, lipid peroxidation, tissue necrosis, glycolysis.**

Введение

Известно, что соединения лития (хлористый литий и карбонат лития) могут оказывать влияние на сигнальные пути и регуляцию клеточного цикла [13, 24]. При этом выявлено, что литий действуя через подавление активности гликоген-синтетазы киназы-3 β [14, 19], может оказывать влияние на развитие апоптоза, активность фактора роста сосудов и хемотаксис нейтрофилов [7, 13]. Показано, что применение солей лития приводит к нейтрофилии и увеличению циркулирующих CD34+ гемопоэтических стволовых клеток [12], сти-

мулирует гранулоцитопоз [7]. Появились работы, показывающие эффективность использования соединений лития для подавления опухолевого роста [22, 25, 27].

В последнее время в связи с развитием нанотехнологий выявляются качественно новые свойства наноразмерных материалов по сравнению с исходными обычными их формами. Необычайно актуальными становятся исследования биологического действия на клетки и ткани организма наноразмерных частиц различного происхождения [5, 20, 21]. Уже выявлены как положительные, так и отрицательные эффекты наночастиц при их применении в условиях нормы и при моделировании патологического процесса. Выявлено, в частности, повреждающее действие на ткани легких различных неорганических наноразмерных частиц при их ингаляционном использовании [4, 5, 15, 20]. Установлено также, что токсичность наночастиц зависит от их размера и дозы [10, 18, 26].

Целью данной работы было исследование биологических эффектов наноразмерных частиц карбоната лития при их внутримышечном введении.

Материал и методы исследования

Экспериментальное исследование проведено на мышах самцах линии СВА массой 18–20 г в возрасте 3 мес., полученных из вивария ИЦиГ СО РАН. Работу с животными проводили с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинской декларации.

Для выявления биологических эффектов неорганических наноразмерных частиц в условиях нормальной жизнедеятельности животные были разделены на две группы. В первую группу вошли интактные мыши, во вторую – животные, получавшие внутримышечно в правое бедро взвесь наноразмерных частиц карбоната лития в объеме 0,1 мл и дозе 0,037 мг на животное, приготовленную на стерильном 0,85 %-м водном растворе хлорида натрия. Забор материала для исследований проводили через 1 сутки после однократного введения частиц карбоната лития, на 5 сутки после четырехкратного введения частиц и на 10-е и 20-е сутки после 5-кратного введения наноразмерных частиц карбоната лития. На каждый срок исследования было взято по 5 животных.

У экспериментальных животных изучали структурные и метаболические изменения в мышечной ткани правого бедра и печени. Дистантные метаболические эффекты изучали в легком, сердце и почке.

Для светооптического исследования биологические образцы мышечной ткани бедра и печени фиксировали в 10 %-м растворе нейтрального формалина, обезживали в серии спиртов возрастающей концентрации и заключали в парафин. Срезы толщиной 5–6 мкм, окрашивали гематоксилином Майера, эозином и заключали в канадский бальзам. Для изучения биологических образцов в просвечивающем режиме электронного микроскопа их фиксировали в 1% растворе OsO_4 на фосфатном буфере ($\text{pH} = 7,4$), дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон. Из полученных блоков готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм, окрашивали толуидиновым синим, изучали под световым микроскопом и выбирали необходимые участки тканей для исследования в электронном микроскопе. Из отобранного материала получали ультратонкие срезы толщиной 35–45 нм на ультратоме LKB-NOVA, контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM 1010.

Полученные микрофотографии морфометрировали с помощью компьютерной программы Image J. Цифровые данные обрабатывали с использованием общепринятых методов статистики, вычисляя среднюю арифметическую величину (M), ошибку репрезентативности средней величины (m) и уровень значимости различий средних величин (p) на основании t -критерия Стьюдента для уровня достоверности 95 % ($p < 0,05$).

Уровень повреждения мышечной ткани оценивали по интенсивности процессов перекисного окисления липидов. Для определения активности перекисного окисления липидов (ПОЛ) образцы мышечной ткани правого бедра гомогенизировали на холоде в гомогенизаторе Поттера в 2 мл 0,85 %-го водного раствора NaCl, содержавшего 0,1 % ЭДТА, затем центрифугировали 15 мин при 4000 об/мин. В гомогенатах определяли активность ПОЛ по концентрации продуктов взаимодействия с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [1]. Концентрацию ТБК-активных продуктов определяли при длине волны 532 нм и выражали в мкмоль/кг, принимая молярный коэффициент экстинкции равным $1,56 \times 10^5$ моль⁻¹ см⁻¹. Для оценки эффективности защиты тканей от продуктов, способных инициировать и интенсифицировать ПОЛ, изучали состояние ферментативного звена антиоксидантной системы – определяли уровень активности каталазы и супероксиддисмутазы (СОД). Функцией каталазы является предотвращение накопления перекиси водорода, образующейся при дисмутации супероксидного аниона и при аэробном окислении флавопротеидов. СОД катализирует дисмутацию супероксидных радикалов и тем самым предотвращает патогенное действие активных форм кислорода. Образующиеся в ферментативных реакциях сравнительно малоактивные супероксидный анион-радикал, и пероксид водорода H₂O₂, как правило, не способны непосредственно инициировать процессы ПОЛ, однако в результате ряда последовательных реакций с участием ферментов и ионов металлов переменной валентности они могут давать начало высокореакционным соединениям, обладающим энергией, достаточной для разрыва С-Н-связей и образования первичных липидных радикалов [2].

Активность каталазы оценивали по методу, основанному на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс. Измерение проводили при длине волны 410 нм и выражали в условных единицах (U) на 100 мг ткани, принимая миллимолярный коэффициент экстинкции перекиси водорода равным $22,2 \times 10^3$ мМ⁻¹ см⁻¹. Активность СОД в гомогенатах ткани определяли по методу Р.Фрайда [8], который основан на способности СОД конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксидные радикалы, образующиеся в результате аэробного взаимодействия восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) и феназинметасульфата. Количественные параметры протекающей реакции измеряли при длине волны 540 нм. За единицу активности принимали 50 % торможение реакции восстановления нитросинего тетразолия, активность фермента выражали в условных единицах (U) на 100 мг ткани. Концентрацию белка измеряли по общепринятому методу Лоури.

Активность аргиназы определяли по скорости образования мочевины [6]. Макрофаги лизировали двукратным замораживанием и размораживанием, после чего к 50 мкл лизата добавляли 50 мкл 50 мМ Трис-HCl (pH = 7,4) и 10 мкл 50 мМ раствора хлорида марганца. Аргиназу активировали нагреванием в термостате при 57 °С в течение 10 мин, создавая влажную среду, смочив предварительно крышку планшета раствором Хэнкса, после чего к пробам добавляли по 100 мкл 0,5 М раствора L-аргинина и инкубировали их в течение 30 мин при 37 °С. Реакцию останавливали помещением планшета на лед в холодильную камеру. Концентрацию мочевины определяли методом двойной энзиматической реакции. Количество продукта реакции измеряли на спектрофотометре SmartSpec Plus (Bio-Rad, США) при длине волны 340 нм.

Определение гемоглобина в гомогенатах ткани проводили с использованием гемиглобинцианидного метода, основанном на том, что гемоглобин при взаимодействии с железосинеродистым калием (красной кровяной солью) окисляется в метгемоглобин, образующий с ацетонциангидрином окрашенный гемиглобинцианид, интенсивность окраски которого пропорциональна количеству гемоглобина. Измерение концентрации гемоглобина выполняли при длине волны 540 нм.

О развитии гипоксии в пораженной опухолью мышечной ткани судили по уровню лактата, концентрацию которого определяли энзиматическим методом. Метод основан на окислении молочной кислоты в пировиноградную ферментом лактатдегидрогеназой при одновременном восстановлении никотинамидадениннуклеотида (НАД⁺) в НАДН. Концентрацию лактата определяли при длине волны 340 нм и выражали в мкмоль/г ткани, молярный коэффициент экстинкции принимали равным $6,22 \times 10^3$ моль⁻¹ см⁻¹. Все измерения выполняли на спектрофотометре SmartSpec Plus (Bio-Rad, США)

Изучение показателей метаболизма проводили в гомогенатах мышечной ткани, взятой в месте инокуляции опухолевых клеток, и печени. Образцы мышечной ткани правого бедра и печени гомогенизировали на холоде в гомогенизаторе Поттера в 2 мл 0,85 %-го водного раствора NaCl, содержавшего 0,1 % ЭДТА, затем центрифугировали 15 мин при 4000 об/мин. Концентрацию молочной кислоты определяли с использованием набора реагентов Boehringer Mannheim (Германия). Уровень триглицеридов определяли, применяя набор реагентов Вектор-Бест (Россия). Уровень гликогена оценивали по методу описанному Волчегорским И.А. [1]. Активность аргиназы и NO определяли выше описанными методами. Для определения NO гомогенат ткани предварительно депротеинизировали добавлением 10 % -й трихлоруксусной кислоты с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 3000 об/мин.

Полученные результаты подвергали общепринятым методам вариационной статистики с использованием дисперсионного анализа ANOVA с последующим анализом межгрупповых отличий с применением критериев Ньюмена–Кейлса или Манна–Уитни.

Результаты исследования

При введении наноразмерных частиц карбоната лития развивались процессы деструкции в мышечной ткани бедра (области введения частиц). Через сутки после введения наноразмерных частиц карбоната лития в область бедра интактным животным в месте введения наблюдали скопления частиц и повышенное количество макрофагов с литием в цитоплазме. Отмечали участки некроза мышечной ткани и признаки воспаления (рис. 1).

При введении в течение 4 сут. наноразмерных частиц карбоната лития в мышечную ткань бедра интактным животным сохранялись повышенное количество макрофагов и нейтрофилов в месте введения, деструкция мышечных волокон (рис. 2).

После внутримышечного введения животным наноразмерных частиц карбоната лития в область бедра через 2 сут. наблюдали усиление активности процессов перекисного окисления липидов в мышечной ткани: концентрация ТБК-активных продуктов увеличивалась в 1,7 раза по сравнению с интактным контролем (рис. 3).

К 5-м сут. после четырехкратного введения наноразмерных частиц интенсивность процессов ПОЛ снижалась в 1,8 раза по сравнению с контролем и в 3 раза по сравнению с предыдущим сроком исследования (однократным введением частиц). Через 10 сут. после пятикратного введения наноразмерных частиц карбоната лития накопление ТБК-активных продуктов ПОЛ возобновилось, и рост их содержания в гомогенатах мышечной ткани бедра составил 1,5 раза по сравнению с интактным контролем и 2,6 раза по сравнению с предыдущим сроком исследования (четырёхкратным введением частиц). К 13-м сут. уровень содержания ТБК-активных продуктов ПОЛ в гомогенатах возвращался к норме и достоверно не изменялся до конца исследования (20 сут.).

Таким образом, динамика концентрации вторичных продуктов ПОЛ после многократного введения наноразмерных частиц карбоната лития носила волнообразный характер. Рост накопления ТБК-активных продуктов в мышечной ткани бедра мышей после однократного введения частиц сменялся снижением их содержания после четырехкратного

введения частиц, затем к 10-м сут. рост накопления продуктов ПОЛ снова возобновлялся, в последующие сроки исследования наблюдали снижение интенсивности процессов ПОЛ до нормы. Подобная динамика процессов ПОЛ косвенно отражает первичное повреждение мышечной ткани наноразмерными частицами карбоната лития и ее вторичное повреждение за счет развития воспалительного процесса.

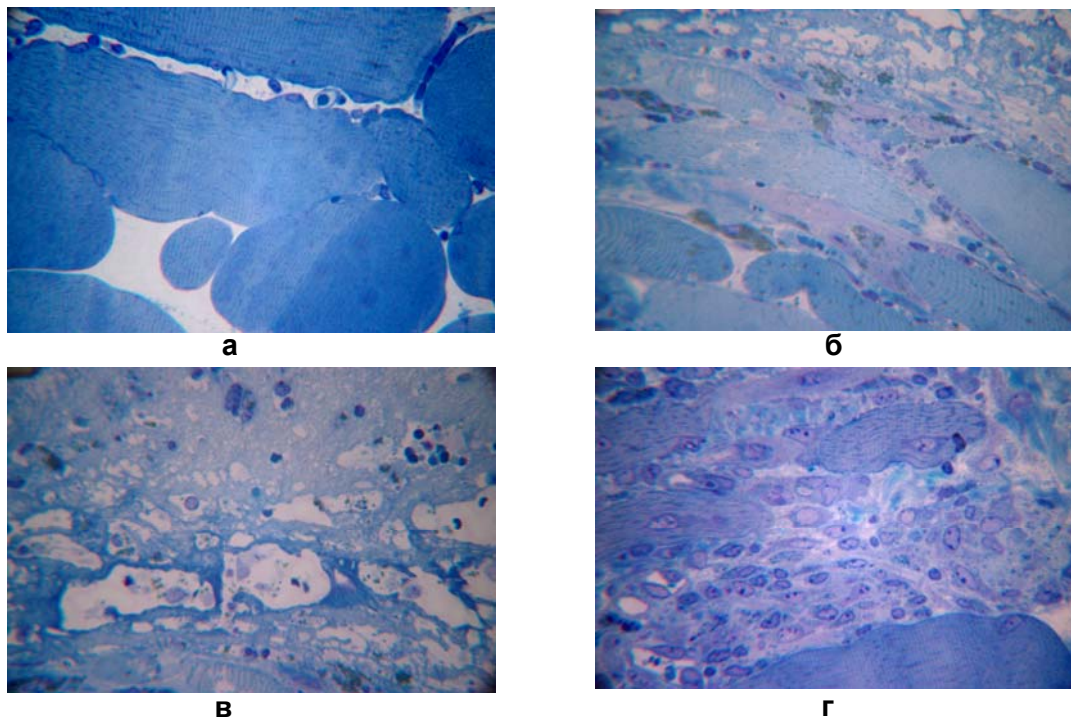


Рис. 1. Структура мышечной ткани через 1 сут. после введения наноразмерных частиц карбоната лития в бедро интактным животным: а – мышечная ткань бедра интактной крысы; б – накопление лития в цитоплазме макрофагов в области введения карбоната лития; в – некроз мышечного волокна; г – развитие воспалительного процесса. Окраска толуидиновым синим. Увеличение 10×40

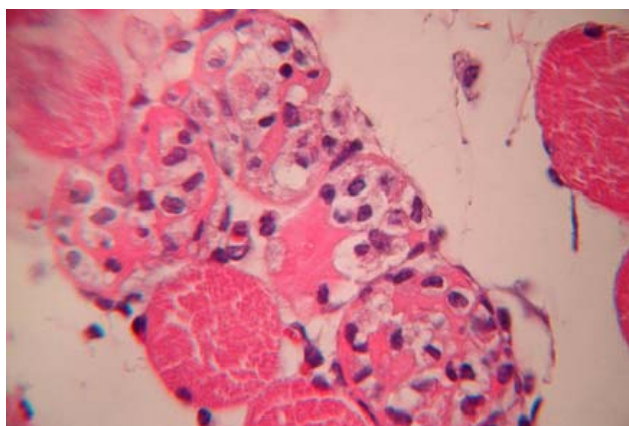


Рис. 2. Деструкция мышечных волокон после четырехкратного введения наноразмерных частиц лития в бедро интактной мыши. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 10×40

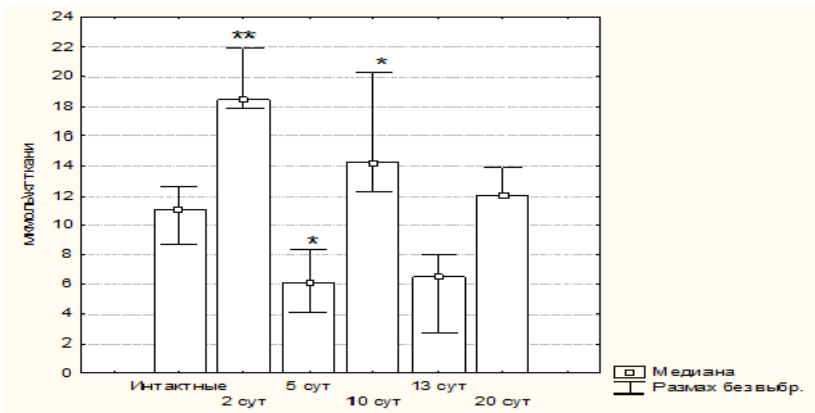


Рис. 3. Содержание ТБК-активных продуктов в мышечной ткани бедра после введения наноразмерных частиц карбоната лития

Проявлению негативного повреждающего действия свободных радикалов и перекисных соединений препятствует многокомпонентная антиоксидантная система, обеспечивающая связывание и рекомбинацию радикалов, предупреждение образования или разрушение перекисей. Исключительно важным моментом эффективности ферментативного звена антиоксидантной системы является сбалансированность активности супероксиддисмутазы (СОД), инактивирующей супероксид анион-радикал, и каталазы, инактивирующей перекись водорода. С этой целью нами исследованы уровни активности данных ферментов. Подавление активности одного из ферментов антиоксидантной системы может привести к избыточному накоплению активных форм кислорода, интенсификации процессов ПОЛ и деструкции клеток.

Активность ферментов в ткани обычно измеряется в пересчете на 1 г белка. Однако одно- и четырехкратное введение наноразмерных частиц карбоната лития индуцировало развитие воспалительного процесса в мышце бедра, что приводило к значительному накоплению белка в поврежденной ткани как за счет инфильтрации, так и за счет продукции медиаторов воспаления белковой природы (цитокины, ростовые факторы) *in situ*: при однократном введении на 2-е сут. в 4,3 раза по сравнению с интактным контролем, при четырехкратном введении на 5-е сут. – в 11 раз (табл. 1). В связи с этим активность антиоксидантных ферментов производили в пересчете на условные единицы активности на 100 мг ткани.

Четырехкратное введение суспензии наноразмерных частиц (5 сут.) ингибировало рост активности каталазы, и показатели активности были в 7,6 раза ниже, чем после однократного введения, и не отличались от контрольного уровня. На 10-е сут. от начала эксперимента после пятикратного введения частиц активность каталазы находилась в пределах нормы, и вновь увеличивалась к 13 суткам, превышая контрольный уровень в 2,3 раза. К концу исследования на 20-е сутки активность каталазы вновь возвращалась к норме. Динамические изменения активности супероксиддисмутазы после введения наноразмерных частиц карбоната лития отличались от изменений уровня активности каталазы. Так, после однократного введения частиц на 2-у сут. активность супероксиддисмутазы не менялась, но после четырехкратного введения на 5 сутки уровень активности этого антиоксиданта падал в 3,1 раза по сравнению с контрольным уровнем (табл. 1). После пятикратного введения частиц активность супероксиддисмутазы на 10-е и 13-е сут. от начала исследования оставалась ниже нормы в 1,2 и 3,4 раза соответственно. На 20-е сут. активность супероксиддисмутазы возвращалась к норме. Динамика содержания ТБК-активных продуктов в мышечной ткани после введения частиц была сопряжена с динамическими изменениями

активности ферментативного звена антиоксидантной системы. Так, максимальное увеличение содержания ТБК-активных продуктов в мышечной ткани бедра на 2-у сут. после однократного введения наноразмерных частиц сочеталось со значительным компенсаторным повышением активности каталазы. Снижение концентрации вторичных продуктов ПОЛ после четырехкратного введения частиц на 5-е сут. сочеталось с уменьшением активности каталазы и супероксиддисмутазы. Повторное повышение активности ПОЛ на 10-у сут. происходило на фоне пониженной активности супероксиддисмутазы. Вновь последовавший рост активности каталазы на 13-у сут. приводил к нормализации уровня показателей ПОЛ на последних сроках исследования.

Таблица 1

Изменение концентрации белка, ТБК-активных продуктов и активности каталазы, супероксиддисмутазы в мышечной ткани бедра после введения наноразмерных частиц карбоната лития ($M \pm m$)

Сроки исследования	Белок, (мкг/мг ткани)	Каталаза, (U/100 мг ткани)	Супероксид дисмутаза, (U/100 мг ткани)	ТБК-активные продукты, (мкмоль/кг ткани)
Интактные (4)	8,14±1,28	24,9±7,7	162,9±6,6	10,86±0,87
2 суток (5)	34,73±10,36**	97,7±14,8**	144,4±32,2	18,34±1,63**
5 суток (4)	90,48±17,66*	12,8±6,3	52,8±12,5*	6,15±1,12*
10 суток (5)	16,45±7,06	25,7±6,1	135,5±8,2*	15,76±1,55*
13 суток (4)	24,36±7,87	63,2±5,8**	47,8±11,3**	8,14±2,72
20 суток (5)	18,47±,87*	55,1±17,4	238,2±52,2	13,07±2,47

Примечание. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ по сравнению с интактным контролем; здесь и далее в скобках указано количество животных.

Через 10 суток от начала введения наноразмерных частиц карбоната лития наблюдали участки регенерации мышечной ткани, скопления макрофагов и фибробластов. В поле зрения возрастало число кровеносных капилляров в сравнении с интактными животными (рис. 4).

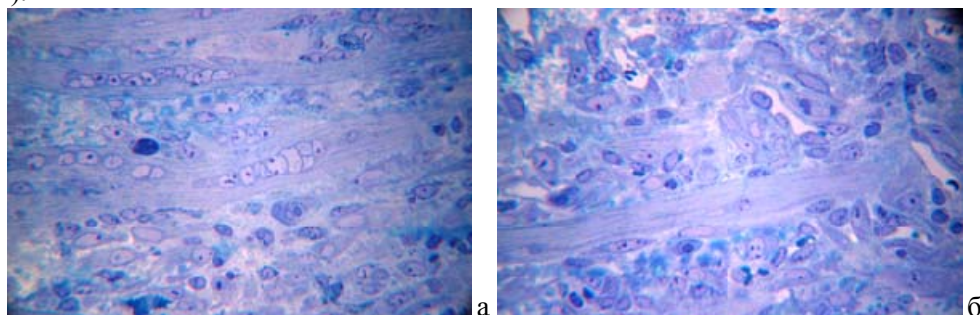


Рис. 4. Регенерация мышечной ткани после введения карбоната лития (а). Образование большого количества кровеносных микрососудов (б). Окраска толуидиновым синим. Увеличение 10×40

После окончания введения наноразмерных частиц карбоната лития активно развивались регенераторные процессы, связанные с восстановлением мышечных волокон, слиянием миофибрилл с образованием миотубов (рис. 5) и накоплением макрофагов и фибробластов. Объемная плотность кровеносных микрососудов в межмышечном пространстве была увеличена в 4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с соответствующим показателем в контроле (рис. 6). К 20-м сут. эксперимента структура мышечной ткани восстанавливалась и не отличалась от нормы.

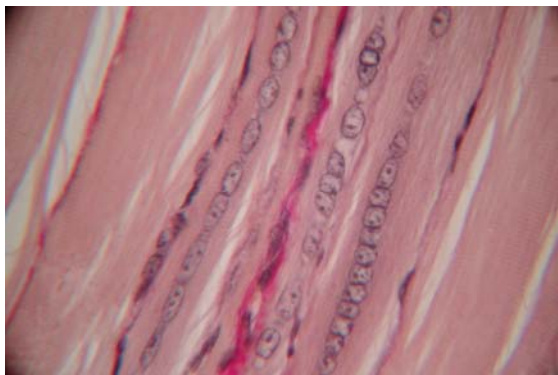


Рис. 5. Образование миотубов через 10 сут. после введения наноразмерных частиц карбоната лития в мышечную ткань бедра интактному животному. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 10×40

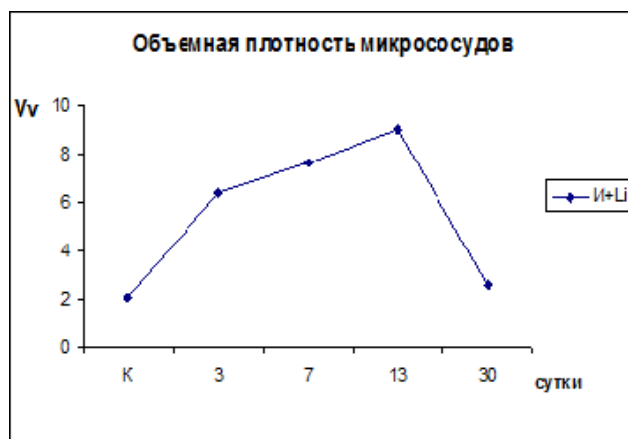


Рис. 6. Объемная плотность (V_v) кровеносных микрососудов в мышечной ткани бедра при введении наноразмерных частиц карбоната лития (И+Li)

Через 1 сут. после однократного внутримышечного введения наноразмерных частиц карбоната лития в паренхиме печени были отмечены немногочисленные инфильтраты нейтрофилов и макрофагов. Структура гепатоцитов и синусоидов была сохранена. После четырехкратного введения наночастиц карбоната лития в паренхиме печени были отмечены очаги некроза гепатоцитов преимущественно в области портальных трактов, кровоизлияния в паренхиму (рис. 7). Цитоплазма жиронакапливающих клеток содержала многочисленные крупные липидные капли.

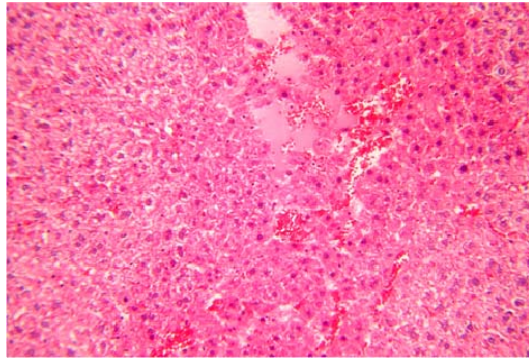


Рис. 7. Очаги некроза гепатоцитов и кровоизлияния в паренхиму печени после окончания внутримышечного введения наноразмерных частиц карбоната лития. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 10×10

Через 5 сут. после окончания введения животным наноразмерных частиц карбоната лития в печени сохранялись локальные очаги некроза гепатоцитов и кровоизлияния в паренхиму. Через 10 сут. после окончания внутримышечного введения карбоната лития структура паренхимы и стромы печени практически не отличалась от нормы.

После внутримышечного введения наноразмерных частиц карбоната лития в фрагментах мышечного волокна, цитоплазме фибробластов и макрофагов обнаруживали электронноплотный материал. Были отмечены фагосомы с частицами лития в цитоплазме гепатоцитов (рис. 8).

Внутримышечные инъекции приводили к транслокации наноразмерных частиц карбоната лития в системную циркуляцию и попаданию в такие жизненно важные органы, как легкие и сердце, что проявлялось усилением в них процессов ПОЛ. При этом динамика накопления вторичных продуктов ПОЛ в легких и сердце была сходной с изменением их содержания в мышечной ткани бедра в локусе введения частиц. Так, после однократного введения в мышцу бедра на 2-е сут. наблюдали не только местное повышение активности процессов ПОЛ, но и усиление ПОЛ в других органах – в легких и сердце в 3,4 и 2,5 раза соответственно по сравнению с величиной этих показателей у интактных животных (табл. 2). После четырехкратного введения наноразмерных частиц карбоната лития на 5-е сут. исследования концентрация ТБК-активных продуктов в легких и сердце снижалась, возвращаясь к контрольному уровню, на 10-е сут. вновь увеличивалась в 3,2 и 2,9 раза соответственно и не отличалась от контрольных величин в последующие сроки – на 13-е и 20-е сут.

В печени после однократного введения наноразмерных частиц карбоната лития на 2-е сут. уровень активности процессов ПОЛ оставался в норме, но после четырехкратного введения на 5-е сут. он снижался, поскольку содержание вторичных продуктов в печеночной ткани оказалось ниже, чем у интактных мышей, в 3,2 раза (табл. 2). На 10-е, 13-е и 20-е сут. после пятикратного введения частиц уровень ТБК-активных продуктов в печени находился в пределах контрольных значений.

В почках уже после однократного введения наноразмерных частиц карбоната лития на 2-е сут. наблюдали снижение интенсивности ПОЛ, так как содержание ТБК-активных продуктов в гомогенатах почек уменьшалось вдвое по сравнению с контролем. Низкий уровень активности ПОЛ сохранялся в почках и после четырехкратного введения частиц на 5-е сут. После пятикратного введения частиц на 10-е сут. концентрация вторичных продуктов ПОЛ в почках возвращалась к норме, и вновь снижалась в 2,2 раза к 13-м суткам и нормализовалась к 20-м суткам.

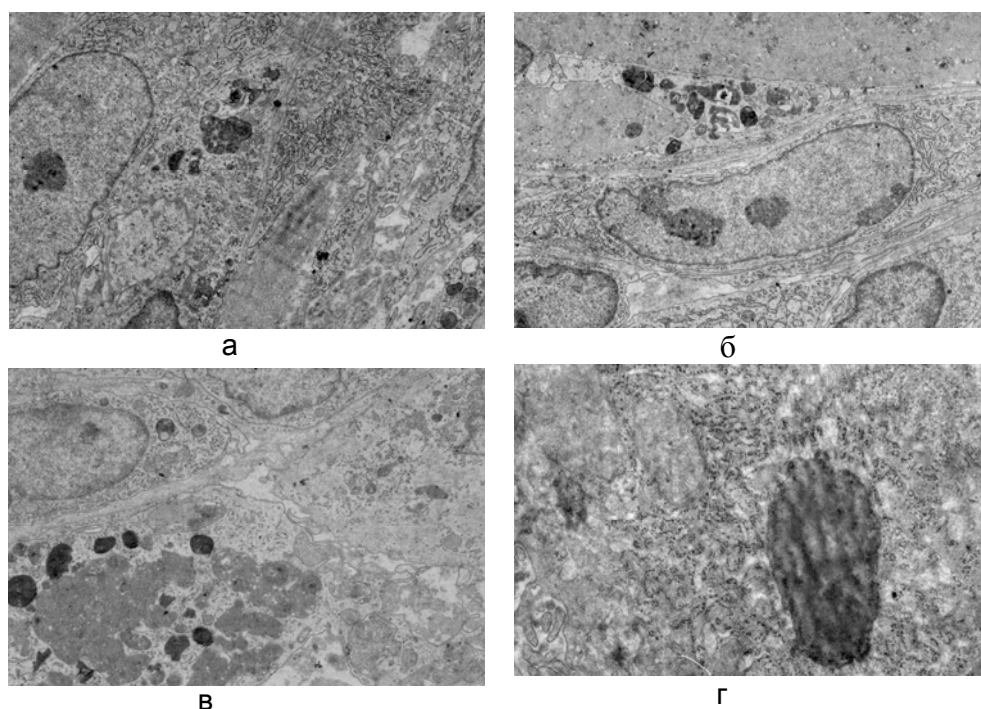


Рис. 8. Накопление наноразмерных частиц карбоната лития в клетках мышечной ткани бедра интактных животных: а – фагосомы с карбонатом лития в цитоплазме фибробласта, увеличение $\times 8000$; б – фагосомы с карбонатом лития в цитоплазме макрофага, увеличение $\times 8000$; в – фагосомы с карбонатом литием в разрушенном мышечном волокне, увеличение $\times 8000$; г – фагосома с наночастицами карбоната лития в цитоплазме гепатоцита, увеличение $\times 15000$

Таблица 2.

Концентрация ТБК-активных продуктов в легких, сердце, печени и почках мышей после введения наноразмерных частиц карбоната лития ($M \pm m$)

Органы	Сроки исследования					
	Интактные	2 сут	5 сут	10 сут	13 сут	20 сут
Легкие	8,1 \pm 0,77	27,3 \pm 11,9**	13,84 \pm 3,23	26,2 \pm 3,69**	13,06 \pm 1,46	9,07 \pm 3,38
Сердце	10,46 \pm 2,68	25,83 \pm 3,2*	5,39 \pm 0,56	30,2 \pm 7,42**	13,06 \pm 0,53	11,57 \pm 2,71
Печень	27,21 \pm 5,76	28,79 \pm 4,19	8,44 \pm 3,91*	21,53 \pm 2,86	21,82 \pm 4,3	25,88 \pm 4,43
Почки	25,98 \pm 4,46	12,68 \pm 3,1*	13,32 \pm 2,97*	27,75 \pm 8,49	11,7 \pm 1,89*	23,36 \pm 1,89

Примечание. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ по сравнению с контролем.

Согласно литературным данным, при использовании в пищу карбоната лития в дозе 2 г на кг пищи в течение месяца в печени и почках самцов крыс активность процессов ПОЛ усиливалась и способствовала накоплению в них вторичных ТБК-активных продуктов

[17]. Концентрация карбоната лития постепенно повышалась в сыворотке крови и сопровождалась нарастанием почечной недостаточности, оцениваемой по уровню креатинина и экскреции мочевины.

Повышение активности процессов ПОЛ в легких после однократного введения наноразмерных частиц карбоната лития в мышцу бедра сопровождалось снижением антиоксидантного статуса легочной ткани: на 2-е сут. активность каталазы и супероксиддисмутазы в органе падала в 3,3 и 2,2 раза по сравнению с контрольным уровнем соответственно (табл. 3). После четырехкратного введения частиц на 5 сутки снижение содержания ТБК-активных продуктов в легких было сопряжено с ростом активности каталазы по сравнению с предыдущим сроком исследования в 1,8 раза. При этом показатели активности каталазы все еще оставались ниже нормы в 1,8 раза. На 5-е сут. уровень активности супероксиддисмутазы в легких продолжал снижаться, и был ниже величин показателей на предыдущем сроке в 1,9 раза и в контроле в 4,1 раза.

Таблица 3

Изменение активности каталазы в легких, сердце, печени и почках мышей после введения наноразмерных частиц карбоната лития (M±m)

Органы	Сроки исследования					
	Интактные	2 сут	5 сут	10 сут	13 сут	20 сут
Легкие	260,8±36,2	78,5±49,3*	144,8±11,9*	192,5±16,6	411±127,7	171±26,5
Сердце	52,0±4,6	27,7±6,3*	20,5±4,6*	34,5±9,7	49,8±9,7	30,3±5,2
Печень	110,7±27,6	95,6±9,5	10,8±8,5*	107,3±24,0	131,5±30,6	152,9±19,0
Почки	168,5±24,5	43,4±12,9**	22,3±7,8*	155,6±14,7	166,0±12,3	144,3±12,5

Примечание. * P<0,05; ** P<0,01 по сравнению с интактным контролем.

Интенсификация ПОЛ в сердце после однократного введения наноразмерных частиц карбоната лития на 2 сутки была, по-видимому, связана со снижением активности антиоксидантных ферментов в сердечной мышце: активность каталазы и супероксиддисмутазы уменьшалась в 1,9 и 3,4 раза соответственно (табл. 3, 4).

Снижение активности процессов ПОЛ в сердце после четырехкратного введения частиц на 5-е сут. происходило одновременно со значительным увеличением активности супероксиддисмутазы как по сравнению с показателями предыдущего срока исследования (в 5,9 раза), так и по сравнению с контрольными показателями (в 1,7 раза). Значительный рост активности супероксиддисмутазы в этот период не сопровождался одновременным повышением активности каталазы, уровень которой был 2,5 раза ниже нормы. После пятикратного введения частиц на 10-е сут. показатели активности каталазы в сердечной мышце повышались и не отличались от контрольного уровня. В то же время показатели активности супероксиддисмутазы также возвращались к норме, снижаясь в 1,8 раза по сравнению с величинами активности данного фермента на предыдущем сроке исследования. В последующие сроки – 13-е и 20-е сут. активность антиоксидантных ферментов в сердце находилась в пределах контрольных значений.

Однократное внутримышечное введение наноразмерных частиц карбоната лития не влияло на интенсивность ПОЛ в печени и соответственно на активность ферментативного

звена антиоксидантной системы. Снижение активности ПОЛ в печени после четырехкратного введения частиц на 5-е сут. сопровождалось снижением активности каталазы на порядок, восстановление уровня ПОЛ в последующие сроки исследования происходило одновременно с нормализацией активности этого фермента. Уровень активности супероксиддисмутазы в печени не менялся при всех вариантах введения наноразмерных частиц.

Таблица 4

Изменение активности супероксиддисмутазы в легких, сердце, печени и почках мышей после введения наноразмерных частиц карбоната лития ($M \pm m$)

Органы	Сроки исследования					
	Интактные	2 сут	5 сут	10 сут	13 сут	20 сут
Легкие	788,8±116,7	361,6±73,4*	188,4±57,9*	644,1±41,98	954,8±263,5	428,7±70,1
Сердце	117,7±30,7	34,49±7,05*	204,0±12,4*	114,0±21,7	148,8±38,6	97,7±38,9
Печень	92,1±21,34	45,2±11,15	51,5±20,34	64,1±27,58	92,6±20,28	136,4±46,72
Почки	142,4±22,0	554,9±18,0**	304,3±42,9*	143,6±7,5	174,7±7,7	140,9±11,1

Примечание. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ по сравнению с контролем.

Снижение интенсивности ПОЛ в почках после однократного на 2-е сут. и четырехкратного введения частиц карбоната лития в мышцу бедра на 5 сутки влекло за собой падение активности каталазы в 3,9 и 7,6 раз по сравнению с контролем соответственно. В то же время показатели активности супероксиддисмутазы в почках на 2-е и 5-е сут. возрастали в 3,9 и 2,1 раза по сравнению с показателями у интактных животных соответственно.

Исходя из данных литературы, при использовании в пищу карбоната лития в дозе 2 г на 1 кг пищи в течение месяца в печени и почках самцов крыс повышение активности процессов ПОЛ сопровождалось ростом активности супероксиддисмутазы и каталазы [17]. При использовании карбоната лития с водой при питье в дозе 150 мг на кг веса тела у крыс наблюдали развитие мультиорганной интоксикации и усиление процессов пероксидации липидов и снижение активности супероксиддисмутазы, каталазы в печени. В то же время у мышей при кормлении их в течение 6 мес. в пищевыми гранулами, содержащими 1 или 2 г карбоната лития на 1 кг уровни интенсивности ПОЛ, активности каталазы и супероксиддисмутазы незначительно отличались от величин контрольных показателей [17]. При введении карбоната лития самцам мышей в дозах 20, 40, 80 мг на 1 кг веса тела ежедневно в течение 14 или 28 дней обнаружено, что при максимальных дозах, вводимых в течение 28 дней, наблюдали активацию ПОЛ и изменение антиоксидантного статуса в печени [17].

Исследовали метаболические изменения в мышечной ткани и печени. Внутримышечное введение наноразмерных частиц карбоната лития индуцировало повреждение мышечной ткани, о чем свидетельствовала интенсификация процессов ПОЛ и увеличение концентрации его вторичных продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. Повреждение, как известно, приводит к развитию воспалительного процесса. Однократное введение наноразмерных частиц карбоната лития, по-видимому, вызывало спазм кровеносных сосудов в мышце правого бедра, что приводило к метаболическим изменениям, свидетельствующим о гипоксии. Молочная кислота (лактат) – продукт анаэробного метаболизма глюкозы (гликолиза), в ходе которого она образуется из пирувата под действием лактатде-

гидрогеназы. При достаточном поступлении кислорода пируват подвергается метаболизму в митохондриях до воды и углекислоты. В анаэробных условиях, при недостаточном поступлении кислорода, пируват преобразуется в лактат. Так, на 2-е сут. после начала инъекций в мышечной ткани резко увеличивалось содержание молочной кислоты, уровень которой возрастал по сравнению с контрольными показателями в 8 раз (табл. 5). После пятикратного введения частиц концентрация молочной кислоты возвращалась к норме, но к 13-м сут. она вновь увеличивалась в 2,7 раза относительно величин контрольных показателей. К 20-м сут. эффект введения наноразмерных частиц карбоната лития на уровень молочной кислоты в мышечной ткани исчезал. Мышцы относятся к основным производителям лактата, а печень – к основным потребителям, где он либо подвергается обратному превращению в глюкозу в процессе глюконеогенеза, либо полностью окисляется в цикле превращения лимонной кислоты.

Таблица 5

Метаболические изменения в мышечной ткани правого бедра после введения наноразмерных частиц карбоната лития (M±m)

Сроки исследования	Показатели			
	Лактат, мкмоль/г ткани	Гликоген, мг/г	Триглицериды, моль/л	ТБК-активные продукты, мкмоль/кг ткани
Интактные (4)	2,38±0,35	4,51±0,87	1,71±0,14	10,9±0,87
2 суток (5)	18,6±9,9**	5,25±0,59	0,47±0,19*	18,3±1,63**
5 суток (4)	–	4,46±0,67	5,04±1,92	6,15±1,12*
10 суток (5)	2,01±0,24	4,33±0,52	3,15±1,01	15,8±1,55*
13 суток (4)	6,24±0,53*	3,28±0,09	–	8,14±2,72
20 суток (5)	3,59±1,71	7,5±2,24	2,61±1,05	13,1±2,47

Примечание. * P<0,05; ** P<0,01 по сравнению с 1-й группой животных.

По нашим данным, после однократного введения наноразмерных частиц карбоната лития (2-е сут.) рост концентрации лактата в мышечной ткани происходил одновременно с накоплением лактата в печени (табл. 6). Снижение образования лактата в мышечной ткани после четырех- и пятикратного введения частиц по сравнению с однократным введением приводило к нормализации уровня лактата в печени, по-видимому, как за счет снижения его в системной циркуляции, так и за счет обратного превращения в глюкозу в печени. Избыток глюкозы в реакции, катализируемой активной гликогенсинтазой, превращался в гликоген: на 5-е сут. после четырехкратного введения наноразмерных частиц карбоната лития содержание гликогена в печени повышалось в 1,8 раза по сравнению с контрольным уровнем (табл. 6).

В экспериментальных исследованиях других авторов показано, что соли лития селективно ингибируют активность гликогенсинтазной киназы-3, которая путем фосфорилирования переводит гликогенсинтазу в неактивное состояние, усиливая гликогенез [14].

Одним из важнейших элементов системного ответа на воспалительный стимул является активация липидного обмена. Триглицериды – главный энергетический резерв орга-

низма. В наших экспериментах после однократного введения наноразмерных частиц карбоната лития на 2-е сут. уровень триглицеридов в мышечной ткани снижался в 3,6 раза

Таблица 6

Метаболические изменения в печени после введения наноразмерных частиц карбоната лития в правую мышцу бедра ($M \pm m$)

Показатели	Сроки исследования		
	Интактные (4)	2 суток (5)	5 суток (4)
Лактат (моль/г ткани)	4,51±0,86	8,17±1,29*	6,45±1,1
Гликоген (мг/г)	3,68±0,7	3,03±0,26	6,77±0,81*
Триглицериды (ммоль/л)	1,14±0,26	1,77±0,39	2,4±0,37*
Аргиназа (U/мг ткани)	1,87±0,38	1,51±0,16	–
НО (нмоль/мг)	5,13±0,96	3,32±1,07	3,32±1,07
ТБК-активные продукты (мкмоль/кг ткани)	27,21±5,76	28,79±4,19	8,44±3,91*

Примечание. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ по сравнению с 1 группой животных.

относительно контрольных показателей. В последующем уровень триглицеридов в мышечной ткани возвращался к норме и оставался таковым до конца исследования. В печени после однократного введения наноразмерных частиц карбоната лития уровень триглицеридов не изменялся, но после четырехкратного введения возрастал вдвое, после пятикратного снижался до контрольных значений (табл. 6, 7). В культуральных исследованиях *in vitro* показано, что хлористый литий не оказывает влияния на образование нейтральных липидных капель в гепатоцитах под воздействием олеиновой кислоты [9].

Фермент аргиназа – один из важнейших метаболитов, способных оказать существенное влияние на различные аспекты воспалительного процесса, в том числе на клетки, участвующие в противоопухолевом иммунитете, регулирующие ангио- и лимфангиогенез [16]. Фермент аргиназа метаболизирует аминокислоту L-аргинин в L-орнитин и мочевины. Аргинин – аминокислота, особенно востребованная в период максимального роста, тяжелого стресса и повреждения. Аргинин стимулирует синтез гормона роста, является донором и естественным переносчиком азота, участвует в цикле переаминирования и выведения из организма конечного азота, то есть продукта распада отработанных белков. От мощности работы цикла орнитин–цитруллин–аргинин зависит способность организма создавать мочевины и очищаться от белковых шлаков. Орнитин является предшественником пролина – аминокислоты, необходимой для синтеза коллагена и полиаминов, ключевых компонентов клеточного роста и дифференцировки. Существуют две формы аргиназы: -1 (35 кДа, гомотример) и -2. Аргиназа-1 синтезируется главным образом в печени, но также обнаружена в эритроцитах, в ткани молочной железы в период лактации и в почках. Они катализируют одну и ту же реакцию, но различаются по уровню экспрессии, регуляции и субклеточной локализации [11]. Аргиназа участвует в детоксикации аммония через уреазный цикл, в опосредованной макрофагами цитотоксичности. Высокая активность фермента наблюдается в растущих тканях, в заживающих ранах, пролиферирующих лимфоцитах и в опухолях. Известно, что аргиназа модулирует иммунный ответ. Уровень аргиназы-1 используют не только в качестве маркера ранних стадий повреждения печени, но и маркера

ра раннего окончания процесса повреждения, например, у больных, которым сделана частичная резекция печени. Повышение уровня аргиназы после операции говорит о восстановлении функции печени, причем аргиназа является более ранним и чувствительным маркером по сравнению с аминотрансферазами (АЛТ и АСТ). Кроме того, уровень аргиназы-1 повышается при многих воспалительных процессах.

Таблица 7

Метаболические изменения в печени после введения наноразмерных частиц карбоната лития в правую мышцу бедра (M±m)

Показатели	Сроки исследования			
	Интактные (4)	10 суток (5)	13 суток (4)	20 суток (5)
Лактат, моль/г ткани	4,51±0,86	–	5,68±1,34	6,08±0,83
Гликоген, мг/г	3,68±0,7	4,78±1,04	4,17±0,91	4,81±0,45
Триглицериды, ммоль/л	1,14±0,26	–	–	–
Аргиназа, У/мг ткани	1,87±0,38	1,09±0,25	1,7±0,5	2,34±0,3
NO, нмоль/мг	5,13±0,96	12,6±4,27	7,1±3,01	7,57±2,12
ТБК-активные Продукты, мкмоль/кг ткани	27,21±5,76	21,53±2,86	21,82±4,3	25,88±4,43

В наших экспериментах при одно-, четырех- и пятикратном введениях наноразмерных частиц карбоната лития повреждение клеточных мембран гепатоцитов, оцениваемое по уровню липопероксидации, не отмечалось. Отсутствие признаков повреждения печени подтверждалось стабильным уровнем активности аргиназы и NO в гомогенатах печеночной ткани на всех сроках исследования (табл. 6, 7).

Заключение

Таким образом, при внутримышечном введении наноразмерных частиц карбоната лития происходит усиление активности процессов перекисного окисления липидов в мышечной ткани бедра, что приводит к некрозу тканей в месте введения с последующим развитием регенераторных процессов. Наноразмерные частицы карбоната лития накапливаются в разрушенных мышечных волокнах, фагосомах макрофагов мышечной ткани бедра и фагосомах гепатоцитов.

После одно- и пятикратного введения наноразмерных частиц карбоната лития в мышечной ткани бедра происходит активация анаэробного гликолиза, о чем свидетельствует накопление молочной кислоты. После однократного введения наноразмерных частиц карбоната лития регистрировали гидролиз триглицеридов, поскольку их уровень в мышечной ткани снижался вчетверо, а после четырех и пятикратного отмечали накопление этих липидов.

Введение наноразмерных частиц карбоната лития вызывает системные изменения метаболизма – способствует повышенной утилизации молочной кислоты в печени с образо-

ванием глюкозы и с последующим использованием ее в синтезе гликогена и триглицеридов. Введение наноразмерных частиц карбоната лития внутримышечно не вызывает значительного повреждения печени, о чем свидетельствует отсутствие достоверного повышения уровней продуктов липопероксидации и активности аргиназы, участвующей в цикле утилизации продуктов распада тканевых белков.

Список литературы

1. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л., Цейликман В.Э. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма. Челябинск: Изд-во Челябинского гос. пед. ун-та, 2000. 167 с.
2. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА, 2008. 284 с.
3. Bergmann M., Garcia-Sastre A., Carnero E. et al. Influenza virus NS1 protein counteracts PKR-mediated inhibition of replication // J. Virol. 2000. N 74. P. 6203-6206.
4. Berntsen P. Biomechanical effects of environmental and engineered particles on human airway smooth muscle cells // J R Soc Interface. 2010. Vol. 7. N 3. P. S331-S340
5. Bonner J. C. Nanoparticles as a Potential Cause of Pleural and Interstitial Lung Disease // Proceedings of the ATS. 2010. Vol. 7. N 2. P. 138-141.
6. Corraliza I.M., Campo M.L., Soler G., Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod // J. Immunol. Methods. 1994. Vol. 174. P. 231-235.
7. Focosi D., Azzarà A., Kast R.E. et al. Lithium and hematology: established and proposed uses // J. Leukoc. Biol. 2009. Vol. 85. P. 20-28.
8. Fried R. Enzymatic and non-enzymatic assay of superoxide dismutase // Biochimie. 1975. Vol. 57. № 5. P. 657-660.
9. Fujimoto Y., Onoduka J., Homma K.J. et al. Long-Chain fatty Acids Induce Lipid Droplet Formation in Cultured Human Hepatocyte in Manner Dependent of Acyl-CoA Synthetase // Biol. Pharm. Bull. 2006. Vol. 29. № 11. P. 2174-2180.
10. Griffitt R.J., Hyndman K., Denslow N.D., Barber D.S. Comparison of Molecular and Histological Changes in Zebrafish Gills Exposed to Metallic Nanoparticles // Toxicol. Sci. 2009. Vol. 107. P. 404-415.
11. Jenkinson C.P., Grody W.W., Cederbaum S.D. Comparative properties of arginases. // Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 1996. Vol. 114. P. 107-132.
12. Kast R.E. How lithium treatment generates neutrophilia by enhancing phosphorylation of GSK-3, increasing HIF-1 levels and how this path is important during engraftment // Bone Marrow Transplant. 2008. Vol. 41. N 1. P. 23-26.
13. Kim H.K., Kim J.E., Chung J. et al. Lithium down-regulates the expression of CXCR4 in human neutrophils // J Trace Elem Med Biol. 2007. Vol. 21. N 3. P. 204-209.
14. Klein P.S., Melton D.A. A molecular mechanism for the effect of lithium on development // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93. P. 8455-8459.
15. Li J.J., Muralikrishnan S., Ng C.-T., Yung L.-Y.L., Bay B.-H. Nanoparticle-induced pulmonary toxicity // Exp Biol Med. 2010. Vol. 235. N. 9. P. 1025-1033.
16. Munder M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system // British Journal of Pharmacology. 2009. Vol. 158. P. 638-651.
17. Nciri R., Allagui M.S., Bourogaa E., Saoudi M., Murat J.C., Croute F., Elfeki A. Lipid peroxidation, antioxidant activities and stress protein (HSP72/73, GRP94) expression in kidney and liver of rats under lithium treatment // J Physiol Biochem. 2011. Vol. 27.
18. Pauluhn J. Pulmonary Toxicity and Fate of Agglomerated 10 and 40 nm Aluminum Oxyhydroxides following 4-Week Inhalation Exposure of Rats: Toxic Effects are Determined by Agglomerated, not Primary Particle Size // Toxicol. Sci. 2009. Vol. 109. P. 152-167.
19. Perez-Costas E., Melendez-Ferro M., Roberts R.C. Light and electron microscopy study of glycogen synthase kinase-3beta in the mouse brain // PloS One. 2010. N 5(1). P. 8911.

20. Rossi E.M., Pylkkänen L., Koivisto A.J., Minnamari Vippola M. et al. Airway Exposure to Silica-Coated TiO₂ Nanoparticles Induces Pulmonary Neutrophilia in Mice // *Toxicol. Sci.* 2010. Vol. 113. P. 422-433.
21. Sperling R.A. Parak W.J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles // *Phil Trans R Soc A.* 2010. Vol. 368. P. 1333-1383.
22. Sun A., Shanmugam I., Song J. et al. Lithium suppresses cell proliferation by interrupting E2F-DNA interaction and subsequently reducing S-phase gene expression in prostate cancer // *Prostate.* 2007. Vol. 67. P. 976-988.
23. Teeguarden J.G., Hinderliter P.M., Brian B.O., Thrall D., Pounds J.G. Particokinetics In Vitro: Dosimetry Considerations for In Vitro Nanoparticle Toxicity Assessments // *Toxicol. Sci.* 2007. Vol. 95. P. 300-312.
24. Teo R., Lewis K.J., Forde J.E. et al. Glycogen synthase kinase-3 is required for efficient Dictyostelium chemotaxis // *Mol. Biol.* 2010. Vol 21. N 15. P. 2788-2796.
25. Wang J.S, Wang C.L, Wen J.F. et al. Lithium inhibits proliferation of human esophageal cancer cell line Eca-109 by inducing a G₂/M cell cycle arrest // *World J Gastroenterol.* 2008. Vol. 14. N 25. P. 3982-3989.
26. Watari F., Takashi N., Yokoyama A., Uo M., Akasaka T., Sato Y., Abe S., Totsuka Y., Tohji K. Material nanosizing effect on living organisms: non-specific, biointeractive, physical size effects // *J R Soc Interface.* 2009. Vol. 6. P. S371-S388.
27. Zhu Q., Yang J., Han S. et al. Suppression of glycogen synthase kinase 3 activity reduces tumor growth of prostate cancer in vivo // *Prostate.* 2011. Vol. 71. № 8. P. 835-845.