

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
\_\_\_\_\_ Е.И. Шишацкая  
« \_\_\_\_\_ » июня 2019г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 - Биология

Особенности метаболических изменений в печени лабораторных мышей  
разных возрастных групп под влиянием фторида натрия

Руководитель

\_\_\_\_\_  
подпись, дата

доцент, к.б.н.

\_\_\_\_\_  
должность, ученая степень

Ю.С. Аكوпова

\_\_\_\_\_  
инициалы, фамилия

Выпускник

\_\_\_\_\_  
подпись, дата

Е.П. Устинова

\_\_\_\_\_  
инициалы, фамилия

Красноярск 2019

## Содержание

Введение.....	4
1 Обзор литературы.....	6
1.1 Роль фтора в организме человека и животных.....	6
1.1.1 Дефицит фтора.....	8
1.1.2 Влияние высоких концентраций фтора на организм человека и животных.....	9
1.2 Токсическое действие фтора и его соединений на живые организмы... 10	
1.2.1 Влияние соединений фтора на проницаемость клеточных мембран 11	
1.2.2 Гормональные и метаболические нарушения при интоксикации фторидами.....	12
1.3 Предельно допустимые концентрации фтора.....	14
1.4 Возрастные морфологические особенности печени лабораторных мышей.....	15
1.5 Характеристика НАД(Ф)Н – зависимых дегидрогеназ.....	17
2 Материалы и методы.....	19
2.1 Объект исследования.....	19
2.2 Потенциометрический метод определения ионов фтора с использованием ионселективного электрода.....	19
2.2.1 Пробоподготовка к определению ионов фтора.....	19
2.2.2 Прямая потенциметрия.....	20
2.3 Пробоподготовка к определению активности ферментов.....	21
2.4 Билюминесцентное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в гомогенате печени.....	22
2.5 Определение содержания белков в гомогенате печени.....	25
2.6 Статистические методы исследования.....	26
3 Результаты и обсуждения.....	27
3.1 Содержание фторид-ионов в гомогенате печени лабораторных мышей 27	
3.2 Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в гомогенате печени... 27	
3.3 Корреляционные взаимосвязи между концентрацией фтора и активностью ферментов в гомогенате печени.....	35
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	39

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	40
Список использованных источников.....	41

## Введение

Одной из важнейших медико-биологических проблем является выяснение молекулярных и физиологических механизмов влияния неблагоприятных повреждающих факторов на организм, в том числе, фтора и его соединений, в частности фторида натрия. Решение данной проблемы имеет важное значение для понимания внутриклеточных защитных механизмов организма.

Важным является изучение воздействия хронического поступления фторидов, которые могут в относительно короткие сроки вызывать различные внутриклеточные и системные расстройства в организме. Актуальность данного исследования связана с необходимостью обоснованного прогноза рисков для здоровья людей, проживающих в регионах с высоким содержанием фторидов в питьевой воде, воздухе, а также имеющих профессиональные контакты с ними [3].

В Российской Федерации колоссальным источником загрязнения атмосферного воздуха фтором является алюминиевая промышленность (от 7,4 до 292 кг/т алюминия поступает в воздушную среду) [3]. Российские заводы являются мировыми лидерами по производству алюминия с общим количеством выпускаемого первичного алюминия 3966350 тонн в год. На сегодняшний день Красноярский и Братский алюминиевые заводы, построенные более 40 лет назад, являются самыми крупными в мире и обеспечивают 57% российского и 7% мирового производства алюминия [4].

Всего в атмосферный воздух предприятиями по производству алюминия выбрасывается около 60 тыс.т. парогазообразных и твердых примесей, из них с содержанием фтора – 4 тыс.т. в год, в котором доля газообразного фтора составляет почти 50 % [5]. Наиболее неблагоприятное действие выбросы алюминиевой промышленности оказывают на расстоянии

0,5–1,5 км от заводов, твердые частицы с содержанием фтора оседают на расстоянии до 5 км, а газообразные соединения обнаруживаются и в 30 км от источника [6]. Воздействие фтористых соединений приводит к абсорбции фторида и транспортировке через кровь к тканям и органам, вызывая в них структурные изменения и функциональные нарушения [8, 9,10, 11, 12]. Поэтому оценка содержания фтора и его распределения в тканях человека и животных может иметь практическое значение.

Несмотря на целевые программы по улучшению экологической обстановки в стране, по-прежнему, выбросы фтористых соединений в окружающую среду остаются высокими.

**Цель:** оценить содержание фторид-ионов и активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в гомогенате печени у лабораторных мышей в условиях хронической интоксикации.

Исходя из цели, были поставлены следующие **задачи:**

1. Провести сравнительный анализ содержания фторидов в гомогенате печени юных и половозрелых лабораторных мышей из контрольной и опытной групп.
2. Сравнить уровни активностей НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в гомогенате печени юных и половозрелых лабораторных мышей из контрольной и опытной групп.
3. Методом корреляционного анализа выявить взаимосвязи концентрации ионов фтора с активностью оксидоредуктаз в исследуемых образцах.

Данная работа выполнялась на базе кафедры медицинской биологии института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета, совместно с ФГБУ "НИИ медицинских проблем севера " СО РАМН.

## 1 Обзор литературы

### 1.1 Роль фтора в организме человека и животных

Фтор является микроэлементом, необходимым для нормальной жизнедеятельности человека. Суточная доза фтора для взрослого человека составляет около 4 мг, при этом 20-25% его поступает с пищей, а остальное – в виде растворенных фторидов с питьевой водой и или в виде рассеянных фтористых соединений в атмосфере.

Интерес к этой проблеме не случаен, так как в настоящее время более 300 миллионов человек алиментарным путем (при ежедневном употреблении питьевой воды и стоматологической продукции) подвергаются воздействию фтора [15].

В организме взрослого человека содержится около 2,5-3 г фтора. Взрослому человеку в сутки необходимо 1,5-5,0 мг. Национальная академия наук США считает безопасным прием от 1,5 до 4 мг фтора в сутки. Исследование влияния суточного поступления фтора в организм человека является важной проблемой и вызывает интерес у многих ученых. Большое внимание зарубежных авторов научных статей сосредоточено на влиянии фтора на здоровье детей как наиболее восприимчивой группы, особенно при изучении формирования кариеса и флюороза [15].

Биологическим действием фторид-иона является его способность эффективно замещать гидроксильный ион не только в апатите костной ткани, но и в деминерализованной ткани, а также, по-видимому, в активном центре ферментов.

Почти 99% всего фтора организма содержится в твердых тканях в составе апатита — основного фосфата кальция, соответствующего формуле  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ . Ион фтора превосходит все остальные ионы по своей

способности замещать гидроксил за счет близости их ионных радиусов, одинакового заряда и степени гидратации, равной двум. Фтор входит в состав апатита либо при образовании первичного кристалла, либо путем замены  $\text{OH}^-$  в трансформированном минерале. Инвиво преобладает второй из этих процессов, особенно у взрослых. Реакция замещения образует смешанную форму апатита, которая соответствует формуле  $\text{Ca}_5\text{F}(\text{PO}_4)_3$ . Содержание фтора в костной и зубной эмали составляет 0,05 моль / кг и указывает на соотношение  $\text{OH}^-$  к фтору в молекуле апатита как 40:1. Преобладающее количество минерализованных тканей содержит менее 0,5 моль / кг фтора, за исключением амалоидных рыб, который очень богат этим микроэлементом.

Первое место по содержанию фтора, если рассматривать твердые ткани, занимают зубной цемент, потом костная ткань, дентин и эмаль. Так у человека и животных фтор вместе с кальцием и фосфором образует и укрепляет костный скелет и зубную эмаль, обеспечивает нормальный рост волос и ногтей, укрепляет иммунитет, способствует выведению солей тяжелых металлов и радионуклидов, предупреждает развитие остеопороза [16].

Кость принимает значительное участие в контроле за концентрацией фтора во внеклеточной жидкости за счет способности быстро связывать его избыток и направлять во внеклеточную жидкость при недостатке.

При снижении pH концентрация фтора уменьшается. Фтор, присоединяясь к гидроксиапатиту, образует фторапатит, хоть на его долю и приходится всего 1/40 апатита, однако именно он придает устойчивость к кислоте и прочность зубам и костям. Фториды способствуют фиксации кальция в твердых тканях и их минерализации, ингибируют липазу, ЛДГ, енолазу, постревматическую, фосфатазу, активируют аденилатциклазу [17,18, 19].

### 1.1.1 Дефицит фтора

Фтор принимает участие в начальных стадиях минерализации твердых тканей. В то же время никаких нарушений этого процесса у экспериментальных животных, содержащихся на дефицитном по фтору рационе в течение нескольких поколений подряд, обнаружить не удалось, как и добиться снижения его концентрации в костях ниже уровня, необходимого, по теоретическим расчетам, для начала процесса минерализации. (0.01 - 0.1 мкмоль/л). Фтор обладает высоким сродством к белку эмалевого матрикса и, будучи включенным в эмаль зубного зародыша до ее минерализации, может способствовать образованию центров кристаллизации апатита [20].

К проявлениям дефицита фтора большинство ученых относят остеопороз и кариес зубов, которые имеют сложную природу. Предупреждает их как дефицит, так и избыток фтора. Из этого следует, что данные, которые мы имеем на данный момент позволяют рассматривать защитный эффект фтора при этих заболеваниях как результат фармакологического, а не физиологического действия этого микроэлемента. Так же, в медицине широко распространена точка зрения, что кариес зубов является наиболее заметным маркером гипофтороза у человека.

У животных, испытывающих недостаточность фтора, отмечается снижение таких ферментов, как щелочная и кислая фосфатаза костной ткани, изоцитратдегидрогеназа печени и др., на 10—20%. Однако, данные различия в активности ферментов пока не удалось связать с клиническими проявлениями дефицита фтора, что явилось бы решающим критерием его жизненной необходимости [21].

### **1.1.2 Влияние высоких концентраций фтора на организм человека и животных**

Высокие концентрации фтора являются токсичными для организма. Симптомы, проявляющиеся при всасывании избытка фтора, многочисленны: флюороз, изменения слизистой оболочки желудка, снижение концентрационной способности почек. Первыми признаками отравления фторидом являются тошнота, рвота, боль в области живота. Если принята доза менее 5 мг/кг массы тела, в качестве противоядия используют кальций – молоко или известковую воду. Если доза превышает эту величину, необходима госпитализация.

Токсическое воздействие фторидов намного чаще встречается при длительном хроническом воздействии на организм человека. При избыточном содержании фторидов развивается хроническая фтористая интоксикация — флюороз. У лиц, проживающих около завода более 5 лет, но никогда не работающих на нем, отмечается высокий уровень содержания фтора в волосах и ногтях, высокий уровень флюороза [22].

Флюороз относится к полисистемному заболеванию, при котором наблюдаются патологические изменения во многих органах и системах. При флюорозе поражаются печень, почки, зубы, нейроэндокринная, сердечнососудистая, костная системы [23].

Избыточное поступление фторидов нарушает белковообразующие функции печени [24]. В сыворотке крови повышается содержание В-глобулинов и альбуминов, гаптоглобина.

Таким образом, фтор и его соединения, проникая в организм человека, способствуют развитию многочисленных нарушений, касающихся всех систем жизнеобеспечения.

## **1.2 Токсическое действие фтора и его соединений на живые организмы**

Воздействие фтора на организм человека может произойти как на улице, так и на рабочем месте, так как он является повсеместным загрязнителем. Фтор присутствует в питьевой воде, зубной пасте, а так же в некоторых лекарственных препаратах, но преимущественно фтор и его соединения поступают в окружающую среду с отходами и выбросами различных отраслей промышленности, таких как: нефтеперерабатывающая, металлургическая, химическая, горно-рудная и деревообрабатывающая промышленности.

Токсичность соединений фтора обуславливается его способами поступления в организм, а так же физико-химическими свойствами соединений. Особое значение в токсичности фтора имеет его растворимость. Высокорастворимые соединения являются более токсичными, чем малорастворимые или нерастворимые.

Сейчас хорошо известно, что избыточное потребление и воздействие фтора проявляется не только в качестве зубного и скелетного флюороза, но может, также, влиять на мягкие ткани. Фтор относительно легко проходит через клеточную мембрану и вызывает структурные и метаболические изменения в печени, почках и головном мозге [7,11,14,25].

Помимо этого было проведено наблюдение за психикой мышей под влиянием фтора, а именно за тревожностью и депрессией. Показано, что добавление фтора в питьевую воду вызывает тревогу и стресс у мышей[12].

Изучение мужской репродуктивной системы под влиянием фторида натрия еще раз доказало проявление флюороза, а также отсутствие воздействия токсиканта на эту систему [29].

Огромное значение в настоящее время уделяется изучению влияния фтора на окислительные процессы в организме. Так, показано, что фторид натрия снижает активность супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы в клетках печени мышей [31,32].

### **1.2.1 Влияние соединений фтора на проницаемость клеточных мембран**

Показано, что ионы фтора изменяют гомеостаз  $Ca^{2+}$  в клетках. Так, при фтористом воздействии сокращается транспорт  $Ca^{2+}$  по эндоплазматическому ретикулуму и через плазматические мембраны в клетках почек, а также в саркоплазматическом ретикулуме кардиомиоцитов в результате уменьшения количества  $Ca^{2+}$  транспортирующих белков и ингибирования  $Ca^{2+}$  насосов.

В клетках нервной системы фтор ингибирует фермент фосфолипазу C, подавляя образование вторичного мессенджера диацилглицерина (ДАГ) и поступление  $Ca^{2+}$  в клетку. Однако в цитозоле клеток других тканей (эритроциты, остеобласты, проксимальные трубочки, фибробласты, эндотелиальные клетки) фтористая интоксикация увеличивала концентрацию  $Ca^{2+}$  [2].

С обменом  $Ca^{2+}$  тесно связан обмен фосфора. Показано, что соединения фтора ингибируют ферменты, регулирующие фосфорно-кальциевый обмен, в частности ингибируется активность  $1\alpha$  гидроксилазы в проксимальных канальцах, в результате чего снижается продукция и содержание в сыворотке крови  $1,25(OH)_2D_3$  кальцитриола [2, 3]. Соединения фтора в эритроцитах, мозге, почках ингибируют  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазу, либо выступают в роли ко-транспортёров, в результате чего поступление фосфора в клетку может снижаться.

Соединения фтора нарушают функции митохондрий, вызывая падение мембранного потенциала и образование гигантской поры в их наружной мембране [20]. Следствием раскрытия поры является набухание митохондриального матрикса, разрыв наружной мембраны митохондрий и выход цитохрома С из межмембранного пространства. Потеря митохондриями цитохрома С приводит к торможению дыхательной цепи, подавлению синтеза АТФ и усилению образования активных форм кислорода (АФК). Кроме того, нарушение барьерных свойств мембран митохондрий под действием ионов фтора приводит к развитию апоптоза.

### **1.2.2 Гормональные и метаболические нарушения при интоксикации фторидами**

Существуют морфологические исследования, показывающие согласованные изменения гипоталамо-нейросекреторной системы, передней доли гипофиза и коры надпочечников при интоксикации фтором. Наблюдается снижение морфофункциональной активности коры надпочечников и аденогипофиза, что может проявляться ингибированием выделения гормонов гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. Итогом такой гормонального изменения является развитие метаболической недостаточности в тканях [2, 3].

Показано, что при фтористой интоксикации повышается функциональная активность основных клеток паращитовидных желёз [24, 37]. В результате этого возрастает уровень гормонов, которые регулируют гомеостаз  $Ca^{2+}$  в организме – паратиреоидного гормона (ПТГ) и кальцитонина. В настоящее время показано, что высокие уровни ПТГ, увеличивая ток  $Ca^{2+}$  в клетки, способствуют разобщению окислительного фосфорилирования, уменьшению образования АТФ, оказывают неблагоприятное влияние на липидный и углеводный обмен

В настоящее время показано, что высокие уровни ПТГ, увеличивая ток  $Ca^{2+}$  в клетках, способствуют отделению окислительного фосфорилирования, снижают образование АТФ, оказывают негативное влияние на углеводный и липидный обмен [25].

Хроническое воздействие фтора на организм способствует изменению содержания в крови тиреотропного гормона (ТТГ) и гормонов щитовидной железы – трийодтиронина (Т3) и тироксина (Т4). Динамика количества этих гормонов зависит от времени воздействия повреждающего фактора. [35, 37]. Гормоны щитовидной железы занимаются регулированием основного обмена и окислительно-восстановительных процессов, исходя из этого, они обеспечивают более интенсивное функционирование всего организма под влиянием повреждающего фактора. Следовательно, при интоксикации фторидами наблюдаются различные изменения в уровне важных адаптивных гормонов в крови – гормонов ГНС, ТТГ, Т3, Т4, ПТГ, кальцитонина и др.

В то же время фазовые изменения уровня этих гормонов отражают компенсаторную реакцию организма в ответ на хроническое воздействие соединений фтора. В особенности, может изменяться активность ферментов, отвечающих за поддержание обмена веществ в организме на физиологическом уровне [27].

Известно, что соединения фтора имеют высокое сродство к некоторым ионам металлов, которые играют роль кофакторов в активности ферментов главных метаболических путей организма. В основном фтор воздействует на ферменты как ингибитор, но иногда он может повышать их активность. Это зависит от таких факторов, как: типа фермента, концентрация и продолжительности воздействия фтора [1, 3]. Таким образом, в микромолярных дозах фтор считает эффективным анаболическим агентом, в то время как миллимолярные концентрации фтора вызывают ингибирование различных ферментов, например фосфатаз (табл.1).

Таблица 1 – Ингибирование металлсодержащих ферментов высокими концентрациями фтора

Ион металла	Фермент	Метаболический путь
Магний	Фосфоглюкомутаза	Синтез гликогена
	Гексокиназа	Фосфорилирование глюкозы
	Глюкозо-6-фосфатаза	Распад гликогена
	Енолаза	Гликолиз
	$\alpha$ Кетоглутаратдегидрогеназа	Цикл Кребса
	Пируваткиназа	Гликолиз
	Дезоксирибонуклеаза	Расщепление ДНК
	Аргининсукцинатсинтетаза	Цикл мочевины
Кальций	Глутаминсинтетаза	Синтез аминокислот, обмен аммиака
	Аденозинтрифосфатаза	Активный транспорт ионов
	Транскетолаза	Пентозофосфатный путь

Так же, ионы фтора имеют способность взаимодействовать с функциональными группами аминокислотных остатков в активном центре ферментов, что также вызывает их негативное влияние на их активность. Таким образом ингибируется активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  АТФазы, что приводит к истощению уровня АТФ в клетке и нарушению клеточного мембранного потенциала [1, 2]. Угнетение выработки АТФ вызывает повышение уровня в клетке АМФ, ГДФ и фосфора неорганического [8].

### 1.3 Предельно допустимые концентрации фтора

Фтор и его соединения способны накапливаться в различных объектах окружающей среды и присутствуют в них в разных количествах [34]. Норма потребления фтора, рекомендованная ВОЗ, для взрослого населения составляет 1,0-1,5 мг/л и 0,6-0,8 мг/л — для детского.

Содержание фторидов в природных водах нормируется. ПДК для водных объектов рыбохозяйственного назначения составляет 0,75 мг/л, для водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового назначения - 0,75 - 1,5 мг/л в зависимости от региона (для средней полосы ПДК = 1,2 мг/л).

Предельно допустимая концентрация фторидов в атмосферном воздухе составляет 0,03-0,2 мг/м<sup>3</sup>[33].

В норме, в печени здоровых животных содержится 0,4-2,2 мг/кг фтора, в мышцах – 0,14-0,58 мг/кг, в почках – 0,52-3,1 мг/кг, в легких – 0,44-1,2 мг/кг фтора[33].

#### **1.4 Возрастные морфологические особенности печени лабораторных мышей**

Микроскопически печень 3-месячных крыс характеризуется дольчатой структурой. Границы клеток тяжело выявить, цитоплазма крупнозернистая. Диаметр гепатоцитов  $13,53 \pm 0,35$  мкм. Печеночные клетки располагаются неправильными рядами, которые ветвятся, направляясь от периферии дольки в сторону центральной вены. Ядра гепатоцитов округлые, имеют хорошо выраженную кариолемму и содержат хорошо видимые ядрышки и глыбки хроматина. Диаметр ядер составляет –  $7,37 \pm 0,29$  мкм. Так же встречаются двуядерные печеночные клетки диаметром до 23,4 мкм и трёхядерные диаметр которых может достигать 25,74 мкм.

Между рядами гепатоцитов находятся синусоиды, в которых в весомых количествах присутствуют форменные элементы крови. Средний диаметр синусоидов  $7,41 \pm 0,39$  мкм. Синусоиды впадают в центральные вены, внутренняя поверхность которых выстлана эндотелием с овально-вытянутыми и палочковидными ядрами, густоокрашенными гематоксилином. Соединительнотканые прослойки в печени 3-месячных животных выражены очень слабо, ввиду чего границы между дольками

неразличимы. Имеющиеся малочисленные прослойки состоят из тонких волокон и клеточных элементов, окружающих междольковые кровеносные сосуды и желчные протоки [14].

Междольковые вены относительно крупные. Они имеют широкий просвет и тонкую стенку, выстланную изнутри плоским эндотелием с густоокрашенными палочковидными ядрами.

Междольковые артерии по диаметру значительно уступают венам. Они имеют узкий просвет и более толстую (по отношению к диаметру их просвета) стенку, наибольший удельный вес в которой приходится на медию.

Междольковые желчные протоки выстланы кубическим низкопризматическим эпителием со слабо выраженной базальной мембраной. Границы эпителиоцитов довольно хорошо различимы. Округлые и овальные ядра клеток слабоокрашены гематоксилином, но имеют хорошо очерченную оболочку.

Общая структура печени 1-летних крыс аналогична таковой у 3-месячных животных. Диаметр гепатоцитов существенно не отличается от диаметра гепатоцитов у предыдущей возрастной группы и составляет  $13,4 \pm 0,31$  мкм, однако в большинстве случаев границы клеток выражены более отчётливо.

Отсутствует выраженная разница в диаметре ядер гепатоцитов. Данный показатель у 1-летних животных составляет  $7,18 \pm 0,18$  мкм. Но нередко обнаруживаются печёночные клетки, ядра которых не имеют отчётливых контуров.

Междольковые соединительнотканые прослойки обнаруживаются реже, чем в печени предыдущей возрастной группы [14].

## 1.5 Характеристика НАД(Ф)Н – зависимых дегидрогеназ

НАД(Ф)Н - зависимые дегидрогеназы – ферменты, принадлежащие к классу оксидоредуктаз, которые в качестве кофермента используют никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ). Существует два вида подобных дегидрогеназ: аэробные и анаэробные. Аэробные дегидрогеназы или оксидазы катализируют перенос протонов (электронов) непосредственно на кислород. Анаэробные дегидрогеназы ускоряют перенос протонов (электронов) на промежуточный субстрат, но не на кислород [15].

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ, КФ 1.1.1.49) осуществляет дегидрирование глюкозо-6-фосфата и кофермента НАДФ. Этот фермент катализирует иницирующую и ключевую реакцию пентозофосфатного цикла.

У человека активность пентозофосфатного цикла относительно высока в активированных клетках иммунной системы, надпочечниках, печени, молочной железе в период лактации и в эмбриональной ткани. Пентозофосфатный цикл имеет большое значение для системы внутриклеточного метаболизма. Он поставляет НАДФН для реакций биосинтеза холестерина, жирных кислот и др. Почти на 50% покрывается потребность клеток в НАДФН за счет пентозофосфатного цикла. Кроме того, продуктами пентозофосфатного цикла являются различные пентозофосфаты, необходимые для реакций синтеза некоторых коферментов и нуклеиновых кислот [15].

Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (ГЗФДГ, КФ 1.1.1.8) осуществляет обратимое окисление глицеро-3-фосфата в диоксиацетонфосфат. Фермент занимает центральное положение в реакциях липидного обмена и участвует в работе  $\alpha$ -глицерофосфатного водородного шунта, с помощью которого

электроны НАДН, синтезированного в цитоплазме, способны включаться в митохондриальную дыхательную цепь [15].

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ, КФ 1.1.1.27) фермент гликолиза, который обратимо катализирует окисление лактата в пируват и использует в качестве кофермента НАД. Данный фермент занимает центральное положение в регуляции цитоплазматического уровня НАД/НАДН. Анаэробная реакция ЛДГ заключается в том, что в случае избытка НАДН в цитоплазме ЛДГ восстанавливает пирувиноградную кислоту до лактата, который затем удаляется из клетки. В то же время, при усилении аэробных процессов ЛДГ может окислять лактат до пирувата с образованием НАДН (аэробная реакция ЛДГ). В этом случае пируват, который образовался при окислении лактата, поступает на реакции цикла трикарбоновых кислот через пируватдегидрогеназный комплекс [15].

Существует два типа изоцитратдегидрогеназы в клетках. НАД-зависимая изоцитратдегидрогеназа (НАДИЦДГ, КФ 1.1.1.41) находится только в митохондриях, а НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа (НАДФИЦДГ, КФ 1.1.1.42) есть как в митохондриях, так и в цитоплазме. НАДИЦДГ осуществляет третью реакцию в цикле трикарбоновых кислот, которая, является лимитирующей [15].

Глутаматдегидрогеназа (ГДГ) осуществляет окислительное дезаминирование L-глутаминовой кислоты. В качестве кофермента глутаматдегидрогеназа использует НАД (КФ 1.4.1.2) или НАДФ (КФ 1.4.1.4). Реакция включает анаэробную фазу дегидрирования глутаминовой кислоты с образованием промежуточного продукта – иминоглутаровой кислоты с последующим самопроизвольным гидролизом с образованием аммиака и  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты. Эти реакции обратимы [15].

## **2 Материалы и методы**

### **2.1 Объект исследования**

Объект исследования – печень лабораторных мышей из вивария Сибирского Федерального Университета.

В работе было использовано 40 самцов лабораторных мышей: 2 опытных группы – 10 неполовозрелых мышей (1 месяц) и 10 половозрелых мышей (7 месяцев); 2 контрольных группы - 10 неполовозрелых мышей (1 месяц) и 10 половозрелых мышей (7 месяцев). Мышей из опытных групп в течение 30 дней поили водой с фторидом натрия в концентрации 50 мг/л. Мыши находились в стандартных условиях с естественной сменой освещения, с соблюдением стандартного рациона питания. У всех животных был свободный доступ к пище и воде.

Эксперименты проводились в соответствии с этическими нормами и рекомендациями по работе с экспериментальными животными, принятыми в Хельсинской декларации.

### **2.2 Потенциометрический метод определения ионов фтора с использованием ионселективного электрода**

#### **2.2.1 Пробоподготовка к определению ионов фтора**

Содержание фторид-иона определяли в печени лабораторных мышей разных возрастных групп.

Перед началом проведения измерений печень следует подготовить. На электронных весах отвешивали 0,19г печени, затем добавляли по 1 мл концентрированной азотной кислоты и оставляли в холодильнике на 12 часов при температуре +5 °С. Пробы сжигали при 120 °С в течение 20 мин. После охлаждения рН проб доводили до 3 цитратом натрия (1,5 М, рН=5,25).

Содержание фторид-иона в пробах определяли с помощью фтор-селективного электрода и выражали в мг/кг.

### 2.2.2 Прямая потенциометрия

Наиболее простым и экспрессным способом определения ионов фтора в воде является потенциометрический метод с применением ионоселективных электродов. Сущность метода заключается в измерении потенциала электродной системы, состоящей из измерительного фторид-селективного электрода, чувствительного к ионам фтора, и вспомогательного хлорсеребряного электрода. Метод позволяет определять содержание ионов фтора в воде в диапазоне 0,19 - 190 мг/л даже в мутных и окрашенных пробах без предварительной обработки. Ионы  $Al^{3+}$  и  $Fe^{3+}$  оказывают мешающее действие на определение фторид-ионов, т.к. связывают ионы фтора в комплексное соединение. Поэтому в состав буфера для создания общей ионной силы добавляют цитрат натрия, который вытесняет фторид-ионы из их комплексов с металлами.

Фторидный электрод имеет форму цилиндра и состоит из корпуса, ионоселективной мембраны и контактного внутреннего электрода. Активной частью электрода является мембрана, представляющая собой монокристалл фторида лантана с добавкой фторида европия [36].

Для определения концентрации фторид-ионов в пробе в измерительный стаканчик помещают пробу и буферный раствор (58,45 г NaCl, 0,357 г цитрата натрия ( $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 5H_2O$ ), 102,06 г ацетата натрия ( $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ ) и 14,4 мл ледяной уксусной кислоты) в соотношении 1:1. Стаканчик устанавливают на магнитную мешалку и погружают в раствор электроды. Через 1 минуту записывают показания прибора - разность электродных потенциалов  $E$  в исследуемом растворе. По калибровочному графику находят

$\lg C_F$ , соответствующий измеренному значению разности электродных потенциалов.

Для построения калибровочной кривой путем последовательного разбавления из основного стандартного раствора фторида натрия готовят градуировочные растворы с концентрацией фторидов  $10^{-2}$ ;  $10^{-3}$ ;  $10^{-4}$ ;  $10^{-5}$ ;  $10^{-6}$  М.

Выполнение измерений основано на изменении потенциала ионселективного электрода в зависимости от активности фторид-ионов в растворе. Измерения проводят в присутствии буферного раствора - индифферентного электролита, поддерживающего в анализируемом растворе определенное значение рН и ионной силы, что позволяет градуировать прибор в единицах концентрации, а не активности фторид-ионов. Концентрацию фторидов в пробе находят, исходя из градуировочной зависимости величины электродного потенциала от значения обратного логарифма активности (концентрации) фторид-ионов (рF). Потенциал ионселективного электрода зависит только от концентрации свободных фторид-ионов. Фториды, присутствующие во взвешенных веществах, либо связанные в прочные комплексы не влияют на величину потенциала электрода [34].

### **2.3 Пробоподготовка к определению активности ферментов**

Полученные образцы ткани нумеровали и замораживали. Перед определением активности ферментов, полученные образцы тканей размораживали и гомогенизировали. Гомогенизацию осуществляли ручным гомогенизатором в течении 10 мин с добавлением бидистиллированной воды, полученный гомогенат центрифугировали при 400 g в течении 10 мин. Супернатант пропускался через марлевый фильтр, полученный гомогенат

замораживали. Полученные образцы использовали для билюминесцентного анализа.

#### **2.4 Билюминесцентное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в гомогенате печени**

Билюминесцентное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ проводится по ранее разработанным методикам [37]. Для этого гомогенат печени (разведение в 16 раз). После однократного замораживания-размораживания печень разрушали путем осмотического лизиса с добавлением дистиллированной воды (1:5 по объему) и 1,0-2,0 мМ дитиотреитола. Затем производили непосредственное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ. Для этого в 150 мкл инкубационной смеси, содержащей соответствующий субстрат и кофактор, вносили 50 мкл суспензии гомогената печени. Конкретные значения концентраций субстратов и кофакторов, а также рН среды для определяемых ферментов представлены в таблице 2. Кроме того следует отметить, что в инкубационную смесь определения активности НАДФИЦДГ и НАДИЦДГ дополнительно добавляли АДФ в концентрациях 2,15 и 1,3 мМ соответственно. В среду инкубации для определения уровней НАДНГДГ и НАДФНГДГ дополнительно вносили  $\text{NH}_4\text{Cl}$  в концентрации 5,0 мМ, а для определения ГР – ЭДТА в концентрации 0,5 мМ.

После инкубации исследуемых проб при 37°C в течение 30 минут (для ферментативных реакций с восстановлением НАД(Ф)+) или 5 минут (для реакций с окислением НАД(Ф)Н) к 200 мкл пробы добавляли 50 мкл флавиномононуклеотида (ФМН) в концентрации  $1,5 \times 10^{-5}$  М, 50 мкл 0,0005% миристинового альдегида и 10 мкл ферментативной системы НАД(Ф)Н: ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза (все реактивы билюминесцентной системы разведены в 0,1 М  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ -фосфатном буфере с рН 7,0).

После смешивания биолюминесцентных реактивов и инкубационной пробы с помощью биолюминометра “БЛМ-8803” (сконструирован в СКТБ “Наука”, г. Красноярск) производили измерение свечения.

Ферментативная система НАД(Ф)Н: ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза изготовлена из очищенных методами ионообменной хроматографии и гель-фильтрации люциферазы из *Photobacterium leiognathii* и оксидоредуктазы из *Vibriofischeri* в Институте биофизики СО РАН г. Красноярска.

Необходимо учесть, что в разрушенных клетках присутствует некоторое количество субстрата для работы исследуемых ферментов. Поэтому мы определяли показатели, названные «субстратный фон ферментов».

Определяли при таких же условиях, что и для вышеперечисленных дегидрогеназ, однако в инкубационную пробу вместо соответствующего субстрата добавляли буфер. В результате измерения свечения на биолюминометре получаем относительные значения активности исследуемых ферментов. Для получения абсолютных значений активности нужно построить график зависимости интенсивности биолюминесценции от концентрации НАД(Ф)Н (калибровочный график). Для этого 200 мкл стандартного раствора НАД(Ф)Н в диапазоне  $10^{-9}$  –  $10^{-4}$  М вносили в кювету биолюминометра, содержащие биолюминесцентные реактивы в концентрациях указанных выше, после чего производилось измерение интенсивности биолюминесценции. В связи с широким диапазоном рН буферов, используемых для определения дегидрогеназной активности, а также рН-зависимостью биолюминесценции ферментативной системы, калибровочные графики строились для каждого рН буфера [37].

Таблица 2 - Концентрация субстратов, кофакторов и показатели pH среды для определения активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в гомогенате печени биолюминесцентным методом

Фермент	Субстрат – мМ	Кофактор – мМ	pH буфера
Г6ФДГ	Г6Ф – 1,5	НАДФ – 0,025	9,8
Г3ФДГ	Г3Ф – 0,5	НАД – 0,35	9,8
ЛДГ	Лактат – 2,0	НАД – 0,50	9,0
МДГ	Малат – 2,0	НАД – 2,50	9,8
НАДФМДГ	Малат – 7,5	НАДФ – 0,375	9,8
НАДФГДГ	Глутамат – 0,5	НАДФ – 1,65	9,8
НАДГДГ	Глутамат – 8,7	НАД – 8,10	9,8
НАДИЦДГ	Изоцитрат – 5,0	НАД – 5,0	7,8
НАДФИЦДГ	Изоцитрат – 1,375	НАДФ – 0,075	7,4
НАДНЛДГ	Пируват – 0,25	НАДН – 0,005	7,0
НАДНМДГ	Оксалоацетат – 0,5	НАДН – 0,005	7,0
ГР	GSH – 0,5	НАДФН – 0,0025	7,4
НАДФНГДГ	Оксоглутарат – 100	НАДФН – 0,0025	7,4
НАДНГДГ	Оксоглутарат – 100	НАДН – 0,0025	7,0

Примечание: среды с pH 9,0 и 9,8 подготовили на Трис-НСI буфере; с pH 7,0, 7,4 и 7,8 – на K<sup>+</sup>,Na<sup>+</sup>-фосфатном буфере.

Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ рассчитывали по формуле :

$$A = \frac{\Delta[C] \times V}{T},$$

где: А-активность фермента;

$\Delta[C]$  – разница концентраций НАД(Ф)Н в пробах “фермент” и “фон фермента”;

V – объем пробы в миллилитрах;

T – время инкубации.

Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ выражали в ферментативных единицах на  $10^4$  клеток, где 1 Е=1 мкмоль/мин [39]. Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ из гомогената печени в пересчете на белок рассчитывали по формуле:

$$A(\text{бел.}) = A/C_{\text{бел.}}$$

где: A(бел.) – активность фермента в пересчете на белок;

A – активность фермента;

$C_{\text{бел.}}$  – количество белка в пробе.

## 2.5 Определение содержания белков в гомогенате печени

Содержание белка определяют биуретовым методом с использованием реактивов фирмы «Агат-Мед».

Таблица 3 - Схема внесения реактивов в пробирки для определения общего белка в гомогенате печени

Отмерить, мл	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная проба
Гомогенат печени	0,10	-	-
Калибровочный раствор общего белка	-	0,10	-
Вода дистиллированная	-	-	0,10
Рабочий раствор биуретового реагента	5,00	5,00	5,00

Принцип метода: ионы меди в щелочной среде взаимодействуют с пептидными связями белков сыворотки крови с образованием комплекса красного цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна

концентрации общего белка и измеряется фотометрически при длине волны 540 (500–560) нм [47]. В пробирки необходимо внести реактивы по схеме указанной в таблице 3.

Содержимое пробирок тщательно перемешать, избегая образования пены, инкубировать при комнатной температуре (+18 – 25° С) в течение 30 минут, после чего измерить величину оптической плотности калибровочной и опытных проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 540 (500–560) нм в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 1 см.

Концентрацию общего белка рассчитать по формуле:

$$C = \frac{E_o}{E_k} \times 60,$$

где: С – концентрация общего белка в опытной пробе, г/л;

Е<sub>о</sub> – оптическая плотность опытной пробы, ед.опт.плотн.;

Е<sub>к</sub> – оптическая плотность калибровочной пробы, ед.опт.плотн.;

60 – концентрация общего белка в калибровочном растворе, г/л

[37].

## **2.6 Статистические методы исследования**

По результатам исследования в пакете электронных таблиц MS Excel была сформирована база данных, на основе которой с помощью пакетов прикладных программ SPSS 8,0 и “Statistica 7,0” производился статистический анализ. Для всех данных определяли медиану (Me) и интерквартильный разброс в виде подсчета 25- (С25) и 75-перцентилей (С75). Проверку гипотезы о статистической достоверности двух выборок проводили непараметрическим методом с помощью критерия Манна-Уитни [13]. Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции по Спирмену [39]. Результаты статистической обработки сведены в таблицы и представлены на графиках.

### **3 Результаты и обсуждения**

Из текста выпускной квалификационной работы изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АФК - активные формы кислорода
- АТФ - аденозин-5'-трифосфат
- АДФ- аденозин-5'-дифосфат
- ГЗФДГ - глицерол-3-фосфатдегидрогеназа
- Г6ФДГ - глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
- ГДГ - глутаматдегидрогеназа
- ГР - глутатионредуктаза
- ЛДГ - лактатдегидрогеназа
- НАДНЛДГ - обратная реакция лактатдегидрогеназы (анаэробная)
- НАДНМДГ - обратная реакция малатдегидрогеназы
- НАДНГДГ - обратная реакция НАД-зависимой глутаматдегидрогеназы
- ПДК – предельно допустимая концентрация
- МДГ-малатдегидрогеназа
- НАД<sup>+</sup> - никотиамидадениндинуклеотид окисленный
- НАДН -никотинамидадениндинуклеотид восстановленный
- НАДФ<sup>+</sup>- никотинамидадениндинуклеотидфосфат окисленный
- НАДГДГ-НАД-зависимая глутаматдегидрогеназа
- НАДИЦДГ - НАД-зависимаяизоцентратдегидрогеназа
- НАДФИЦДГ - НАДФ-зависимая изоцетратдегидрогеназа
- НАДФМДГ- НАДФ-декарбоксилирующаямалатдегидрогеназа (малик-фермент)
- НАДФГДГ - НАДФ-зависимая глутаматдегидрогеназы
- НАДН-ГДГ - НАДН-зависимая реакция глутаматдегидрогеназы
- НАДН-ЛДГ- НАДН-зависимая реакциялактатдегидрогеназы( анаэробная)
- НАДН-МДГ - НАДН-зависимая реакция малатдегидрогеназы
- НАДФН-ГДГ- НАДФ-зависимая реакция глутаматдегидрогеназы
- НАДФН-никотиамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный

## Список использованных источников

1. Жовтяк, Е.П. Биомаркеры экспозиции и эффекта действия фтористых соединений у рабочих алюминиевой промышленности / Жовтяк Е.П., Федоров А.А., Лихачева Е.И.// Медицина труда и промышленная экология. - 2010. - №2.- С.20-23.
2. Грушко, Я. М. Вредные неорганические соединения в промышленных сточных водах / Я.М. Грушко. – Л.: Химия, 1979. – 160 с.
3. Гигиенические критерии состояния окружающей среды. Вып. 36. Фтор и фториды: Пер. с англ.– М.-Женева: Медицина-ВОЗ, 1989. – 114 с.
4. Дампилон, Ж. В. Эколого-экономическая эффективность процессов производства в алюминиевой промышленности (на примере Красноярского алюминиевого завода): автореф. дис. ... канд. экономич. Наук: 08.00.05 / ДампилонЖаргал Валерьевич.–М.,2009. – 154 с.
5. Донских, И.В. Влияние фтора и его соединений на здоровье населения / И.В. Донских // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. -2013.- №3(91). - Ч.2 - С. 179-185.
6. Николаева, Л. А. Хроническая интоксикация фтором и его соединениями / Л.А. Николаева // Естествознание и гуманизм.– 2012. – Т. VI. – № 1. – С.2-5.
7. Шалина, Т. И. Общие вопросы токсического действия фтора / Шалина Т.И., Васильева Л.С. // Сибирский медицинский журнал. – 2009. – № 5. – С. 5–8.
8. Yamaguti, P. M. Effects of Single Exposure of Sodium Fluoride on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Salivary Glands of Rats] / P. M. Yamaguti, [et al] //Oxidative medicine and cellular longevity.- 2013. –V. 2013. – 7 p.

9. Deng, Y. Effects of High Dietary Fluorine on Erythrocytes and Erythrocyte Immune Adherence Function in Broiler Chickens / Deng Y., [et al]// Biol Trace Elem Res.- 2013. –V.155.- I.2.- P.247–252.
10. Atmaca,N. Protective effect of resveratrol on sodium fluoride-induced oxidative stress, hepatotoxicity and neurotoxicity in rats / Atmaca N. [et al]// Food and Chemical Toxicology . - 2014. - V. 70.- P.191-197.-
11. Zhao, J. Toxic effects of fluoride on primary lymphoid organs and white blood cells in female mice / J. Zhao, H. Wang,E. Tian,F. Dong, B. Zhou// Fluoride. – 2014. – V.47.- I. 3 - P. 227-234.
12. Kivraka, Y. Effects of fluoride on anxiety and depression in mice / Kivraka Y.// Fluoride.-2012.-V. 45.- I.3. -P. 302-306.
13. Окружающая среда. Энциклопедический словарь-справочник: Немецко-русский словарь по охране окружающей среды : пер. с нем. – М. : Прогресс, 1993 . – 640 с.
14. Плахтий, Л. Я. Хроническое токсическое действие фторида натрия на функции почек крыс в эксперименте / Плахтий Л.Я [и др.]// Фундаментальные исследования.- 2013.- № 11. – С.696-700.
15. Савченко, А. А. Основы клинической иммунометаболомики: учебник/ А. А. Савченко, А. Г. Борисов – Новосибирск: Наука, 2012. – 25-35 с.
16. Калетина, Н.И. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов /Н.И. Калетина- М.: ГЭОТАР- Медиа, 2009. - С.907-911.
17. Власюк, П.А. Использование микроэлементов в сельском хозяйстве УССР /Власюк П.А., Доля В.С. -Киев: Госиздат с.-х. литературы УССР, 1963. - С. 6-22.
18. Зайчик А.Ш., Основы патохимии /Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. - СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2001. - 687 с.

19. Гайдаш, А.А. Влияние терапевтических доз фтора и цеолитового энтеросорбента на ультраструктуру печени /Гайдаш А.А., Цуканов В.В. // Гепатология. - 2005. - № 5. - С.24-28.
20. Crenshaw, M.A. Fluoride incorporation into developing enamel teeth in the domestic pig/Crenshaw M.A., Bawden J.W//Arch oral Biol.- 1975.-№20.-P. 877-883.
21. Ayo-Yusuf, O.A. Fluoride concentration of bottled drinking waters/Kroon J., Ayo-Yusuf I.J.,Ayo-Yusuf O.A // SADJ: S. Afr. Dent. J. - 2001. - Vol. 56. - № 6. - P.273-276.
22. Калетина, Н.И. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов /Н.И. Калетина - М.: ГЭОТАР - Медиа, 2009. - С.907-911.
23. Inkielewicz-Stepniak, I. Effect of exposure to fluoride and acetaminophen on oxidative/nitrosative status of liver and kidney in male and female rats / Inkielewicz-Stepniak I., Knap N. // Pharmacological reports.-2012.- №64.- P.902-911.
24. Ефимова, Н. В. Оценка воздействия фтора на детское население Иркутской области / Ефимова Н.В., Дорогова В.Б., Журба О.М., Никифорова В.А. // Медицина труда и промышленная экология. – 2009. – № 1. – С. 23–26.
25. Свинолупова, Л. С. Ответные реакции растений ячменя на действие фторида натрия / Свинолупова Л. С., Огородникова С. Ю., Ашихмина Т. Я.// Вестник Алтайского государственного аграрного университета.- 2012.-№12.-С. 17-20.
26. Дроганова, Т. С. Активность кислой фосфатазы в печени живородки речной (*Viviparusviviparus*) при воздействии фторид-иона / Дроганова Т.С., Поликарпова Л.В., Петренко Д.Б., Васильев Н.В.// Вестник МГОУ. Серия: Естественные науки.- 2014.- № 5.- С.14-19.
27. Комарова, Н.А. Влияние питьевой воды с повышенным содержанием ионов железа, кальция, магния и фтора на показатели

крови и почек белых крыс / Комарова Н.А., Шубина О.С.//  
Современные проблемы науки и образования.- 2014.- № 5.- С. 592.

28. Gutiérrez-Salinas, J. In Vitro Effect of Sodium Fluoride on Malondialdehyde Concentration and on Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase in Human Erythrocytes / J. Gutiérrez-Salinas [et al.]// The ScientificWorld Journal.- 2013.-V.2013.- 7 p.

29. Leite, A. L. Proteomic Analysis of Gastrocnemius Muscle in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes and Chronically Exposed to Fluoride / A. L. Leite [et al.]// PLoS One.- 2014.- V. 9.- I.9.-P. 1-10.

30. Хазимова, Л.А. К вопросу унификации методов определения фтора в объектах окружающей среды / Л.А. Хазимова, Т.Л. Радовская, Н.В. Круглова, Т.К. Качалкова // Актуальные проблемы гигиены в металлургической и горнодобывающей промышленности: сб науч. тр. - М., 1985. - С.59-67.

31. Dirks, B.: The benefits of water fluoridation/ Dirks B.// Caries Res. -1974.- №8.-P. 2-15.

32. ГН 2.1.6.695-98 Предельно допустимые концентрации (ПДК) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест. – Москва:Минздрав России, 2003г. с изменениями на 2016г.- 56 с.

33. Березов, Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. - М.: Медицина, 1998. - 704 с.

34. Ревич, Б. А. Экологическая эпидемиология: учебник для высш.учеб. заведений / Б. А. Ревич, С. Л. Авалиани, Г. И. Тихонова – М.: Академия, 2004. – 384 с.

35. Линева, А. Б. Физиологические показатели нормы животных / Линева А. Б. - М.: Аквариум , 2001. – 256 с.

36. Меньшикова, В. В. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / В. В. Меньшикова – М.:Медицина. – 1987. – 364 с.

37. Савченко, А.А., Высококчувствительное определение активности дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови биолюминесцентным методом / А. А. Савченко, Л. Н. Сунцова // Лаб. дело. - 1989. - № 11. - С. 23-25.
38. Березов, Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. - М.: Медицина, 1998. - 704 с.
39. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica/О. Ю. Реброва. – М.: Медиасфера, 2003. – 305 с.
40. Luo, C. NADH-tetrazolium-coupled sensitive assay for malate dehydrogenase in mitochondria and crude tissue homogenates / Luo C. [et al.] // J. Biochem. Biophys. Methods. - 2006. - Vol. 68, №2. - P. 101-111.
41. Зубарева, О. Н. Зонирование ландшафтов, подверженных техногенному воздействию выбросов Норильского горно-металлургического комбината / О. Н. Зубарева, Л. Н. Скрипальщикова, Н. В. Грешилова, В. И. Харук // Экология. - 2003 . - № 6 . - С. 415-419
42. Шульга, А. И. Эпидемиологические особенности заболеваемости инфекциями верхних дыхательных путей населения в регионах с разной антропогенной нагрузкой / А. И. Шульга, Е. А. Васильев, П. Н. Скачков // Пульмонология - 2004. - № 3. - С.43-48
43. Catcott, E. J. Air pollution. Effect of air pollution on animals: monograph / E.J. Catcott. -Geneva: World Health Organization, 1961. – 221 p.
44. Kotin, P. O. The experimental induction of pulmonary tumors in Strain A mice after their exposure to an atmosphere of ozonized air / P. O. Kotin., H. L. Falk. – Philadelphia, 1956. – P. 910-917.
45. Xu, X. Effect of Early Particulate Air Pollution Exposure on Obesity in Mice: role of p47phox / Z. Yavar [et al.] // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. - 2010. - №8. - 12 p.

46. Семенова, О. А. Активность некоторых дегидрогеназ в тканях черноморских мидий в условиях действия хлоридов тяжелых металлов / О. А. Семенова // Вестник Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина. Серия: Биология . - 2013. - № 1056. - С. 33-36.

47. Савченко, А. А. Основы клинической иммунометаболомики А. А. Савченко, А.Г. Борисов. - Новосибирск: Наука, 2012. - 263 с.

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

Е.И. Шишацкая

« 6 » июня 2019г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 - Биология

Особенности метаболических изменений в печени лабораторных мышей  
разных возрастов под влиянием фторида натрия

Руководитель

ff - 7.06.19  
подпись, дата

доцент, к.б.н.

должность, ученая степень

Ю.С. Аكوпова

инициалы, фамилия

Выпускник

Е.П. / 7.06.19  
подпись, дата

Е.П. Устинова

инициалы, фамилия

Красноярск 2019