

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
Е.И.Шишацкая  
подпись \_\_\_\_\_ инициалы, фамилия  
« \_\_\_\_ » июня 2021г.

## **МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Изучение метаболического статуса при воздействии фторида натрия *in vivo*

06.04.01 Биология  
06.04.01.05 Реконструктивная биоинженерия

Научный руководитель	доцент, к.б.н.	<u>Ю. С. Акопова</u>
подпись, дата	должность, ученая степень	ициалы, фамилия
Выпускник	доцент, к.б.н.	<u>Е. П. Устинова</u>
подпись, дата	должность, ученая степень	ициалы, фамилия
Рецензент	доцент, к.б.н.	<u>И.С.Коротченко</u>
подпись, дата	должность, ученая степень	ициалы, фамилия

Красноярск 2021

## **АННОТАЦИЯ**

В работе изучено накопление фторидов в скелетной ткани, печени и почках лабораторных мышей, а также влияние фторидов на метаболический статус печени и почек лабораторных мышей. Опытные группы мышей в течение месяца поили водой с фторидом натрия в концентрации 50 мг/л. Потенциометрическим методом обнаружено, что уровень фторида в бедренной кости, печени и почках в опытной группе был достоверно выше, чем в контрольной ( $p < 0,05$ ). Биолюминесцентным методом показано, что в гомогенате печени лабораторных мышей, подвергшихся фтористой интоксикации обнаружено достоверное повышение активности Г6ФДГ и ГР и снижение активности ЛДГ, НАДФГДГ, НАДГДГ и НАДИЦДГ, а гомогенате почек лабораторных мышей, подвергшихся фтористой интоксикации обнаружено достоверное повышение активности Г6ФДГ, Г3ФДГ, МДГ, НАДФИЦДГ и НАДФМДГ, а также снижение активности ЛДГ.

**Ключевые слова:** ФТОРИД НАТРИЯ, НАКОПЛЕНИЕ, ПЕЧЕНЬ, ПОЧКИ, ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ.

## **РЕФЕРАТ**

Магистерская диссертация по теме «Изучение метаболического статуса при воздействии фторида натрия *in vivo*» содержит 58 страниц текстового документа, 13 иллюстраций, 4 таблицы, 75 использованных источников.

**ФТОРИД НАТРИЯ, ПЕЧЕНЬ, ПОЧКИ, ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ, НАКОПЛЕНИЕ.**

Объект: печень, почки и бедренная кость лабораторных мышей из вивария Сибирского Федерального Университета, кафедры медицинской биологии.

Цель исследования – изучить метаболический статус при воздействии фторида натрия *in vivo*.

Задачи:

1. Провести анализ содержания фторидов в бедренной кости, печени и почках лабораторных мышей из контрольной и опытной групп.
2. Оценить уровень активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в гомогенате печени лабораторных мышей из контрольной и опытной групп.
3. Оценить уровень активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в гомогенате почек лабораторных мышей из контрольной и опытной групп.

Актуальность диссертационной работы

В связи с тем, что мы проживаем в регионе с высоким содержанием фторидов, актуальность данного исследования связана с необходимостью изучения накопления данного элемента в различных органах животных, а также механизмов их воздействия на активность ферментов.

В результате проведенного исследования было выявлено, что у мышей, подвергшихся воздействию фторида натрия уровень фтора в бедренной кости, печени и почках был достоверно выше, чем в контрольной группе ( $p < 0,05$ ): в 3,8 раза в бедренной кости, в 2,8 раза печени и в 1,6 раз почках. Наш анализ подтвердил, что фтор обладает способностью проникать через клеточные мембранны, а воздействие повышенных концентраций приводит к накоплению этого элемента в тканях, в том числе в мягких тканях.

Также в гомогенате печени лабораторных мышей, подвергшихся фтористой интоксикации обнаружено достоверное повышение активности Г6ФДГ и ГР и снижение активности ЛДГ, НАДФГДГ, НАДГДГ и НАДИЦДГ, а в гомогенате почек повышение активности Г6ФДГ, Г3ФДГ, МДГ, НАДФИЦДГ и НАДФМДГ, а также снижение активности ЛДГ.

## **ABSTRACT**

The master's thesis on the topic "Study of the metabolic status under the influence of sodium fluoride in vivo" contains 58 pages of a text document, 13 illustrations, 4 tables, 75 sources used.

**SODIUM FLUORIDE, LIVER, KIDNEY, OXIDOREDUCTASE, ACCUMULATION.**

Object: liver, kidneys, and femur of laboratory mice from the vivarium of the Siberian Federal University, the Department of Medical Biology.

The purpose: to study the metabolic status under the influence of sodium fluoride in vivo.

Research objectives:

1. To analyze the fluoride content in the femur, liver, and kidneys of laboratory mice from the control and experimental groups.
2. To evaluate the activity level of NAD (F)-dependent dehydrogenases in the liver homogenate of laboratory mice from the control and experimental groups.
3. To evaluate the activity level of NAD (F)-dependent dehydrogenases in the kidney homogenate of laboratory mice from the control and experimental groups.

The relevance of the dissertation

Because we live in a region with a high content of fluorides, the relevance of this study is associated with the need to study the accumulation of this element in various animal organs, as well as the mechanisms of their effect on the activity of enzymes.

As a result of the study, it was found that in mice exposed to sodium fluoride, the level of fluoride in the femur, liver and kidneys was significantly higher than in the control group ( $p < 0.05$ ): 3.8 times in the femur, 2.8 times in the liver and 1.6 times in the kidneys. Our analysis confirmed that fluoride can penetrate cell membranes, and exposure to elevated concentrations leads to the accumulation of this element in tissues, including soft tissues.

Also, in the liver homogenate of laboratory mice subjected to fluoride intoxication, a significant increase in the activity of G6FDH and GR and a decrease in the activity of LDH, NADPHDH, NADHDH and NADICDH were found, and in the kidney homogenate, an increase in the activity of G6FDH, G3FDH, MDH, NADPHDH and NADPHMDH, as well as a decrease in the activity of LDH.

## **Содержание**

Введение.....	8
1 Обзор литературы .....	11
1.1 Роль фтора в организме человека и животных.....	11
1.1.1 Влияние различных концентраций фтора на организм человека и животных .....	13
1.2 Метаболические нарушения при интоксикации фтором и его соединениями .....	15
1.3 Особенности метаболизма костной ткани в норме и при патологии ....	18
1.4 Особенности метаболизма почек в норме и при патологии .....	21
1.5 Особенности метаболизма печени в норме и при патологии.....	23
1.6 Характеристика НАД(Ф)Н – зависимых дегидрогеназ.....	25
2 Материалы и методы .....	28
2.1 Объект исследования.....	28
2.2 Потенциометрический метод определения ионов фтора с использованием ионселективного электрода.....	29
2.3 Биолюминесцентное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в гомогенате печени и почек .....	31
2.5 Определение содержания общего белка в гомогенате печени и почек	34
2.6 Статистические методы исследования .....	35
3 Результаты и обсуждения.....	36
3.1 Анализ содержания фторид-ионов в бедренной кости, печени и почках лабораторных мышей .....	36
3.2 Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в гомогенате печени ....	36
3.3 Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в гомогенате почек.....	36
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	36
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	37
Список использованных источников .....	38

## **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 обнаружаются 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:** изучить метаболический статус при воздействии фторида натрия *in vivo*.

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

1. Провести анализ содержания фторидов в бедренной кости, печени и почках лабораторных мышей из контрольной и опытной групп.
2. Оценить уровень активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в гомогенате печени лабораторных мышей из контрольной и опытной групп.
3. Оценить уровень активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в гомогенате почек лабораторных мышей из контрольной и опытной групп

Полученные автором результаты могут быть использованы в разработках профилактических мероприятий по сохранению здоровья населения города Красноярска.

Экспериментальные данные о содержании концентрации ионов фтора в ткани бедренной кости использованы из магистерской диссертации Лесковой Ирины Борисовны (2018г). Исследование по содержанию фторидов в

гомогенате почек проведено совместно с бакалавром Рогачевой Татьяной Алексеевной.

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.

Основная биологическая роль фтора и его соединений – костеобразование, формирование дентина, зубной эмали, предупреждение развития старческого остеопороза. Фтор участвует и во многих биохимических реакциях в качестве как активатора ферментов (аденилатциклазы), так и ингибитора ферментов (липазы, эстеразы и лактатдегидрогеназы), метаболизма йода и тиреоидных гормонов, синтеза нуклеиновых кислот, белков и липидов [14]. 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. 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  $\text{Ca}_{10}(\text{RO}_4)_6(\text{OH})_2$ . 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. Большинство минерализованных тканей содержит менее 0,5 моль/кг фтора, однако эмалоид рыб очень богат этим микроэлементом, там его содержание выше.

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, активируют аденилатциклазу [17, 18, 19].

### **1.1.1 Влияние различных концентраций фтора на организм человека и животных**

Фтор принимает участие в начальных стадиях минерализации твердых тканей. В то же время никаких нарушений этого процесса у экспериментальных животных, содержавшихся 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].

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 принятая доза менее 5 мг/кг массы тела, в качестве противоядия используют кальций – молоко или известковую воду. Если доза превышает эту величину, необходима госпитализация.

Токсическое действие 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.

Теперь стало хорошо известно, что чрезмерное потребление и воздействие фтора проявляется не только в качестве зубного и скелетного флюороза, но может, также, влиять на мягкие ткани. Фтор относительно

легко пересекает клеточную мембрану и вызывает структурные и метаболические изменения в печени, почках и головном мозге [7, 11, 14, 25].

Литературные данные показывают, что фтор активирует перекисное окисление липидов и активность ферментов антиоксидантной защиты во всех исследованных организмах [8, 26, 27]. Кроме того, он может снижать активность кислой фосфатазы [28]. На фтор высокого содержания диете у бройлеров был зафиксирован сниженный уровень гемоглобина, общего числа эритроцитов (что может привести к анемии) и иммунных функций эритроцитов [9], а у мышей выявлено снижение общего числа лейкоцитов и повреждение ДНК и ультраструктуры иммуноцитов [11].

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

## **1.2 Метаболические нарушения при интоксикации фтором и его соединениями**

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].

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

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

С обменом  $\text{Ca}^{2+}$  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)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> кальцитриола [2, 3]. Соединения фтора в эритроцитах, мозге, почках ингибируют  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ 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 мембранны митохондрий и выход цитохрома С из межмембранного пространства. Потеря

митохондриями цитохрома С приводит к торможению дыхательной цепи, подавлению синтеза АТФ и усилинию образования активных форм кислорода. Кроме того, нарушение барьерных свойств мембран митохондрий под действием ионов фтора приводит к развитию апоптоза.

Известно, что соединения фтора имеют высокое средство 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, концентрации и продолжительности воздействия фтора [1, 3].

Таким образом, в микромолярных дозах фтор считается 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
	αКетоглутаратдегидрогеназа	Цикл Кребса
	Пируваткиназа	Гликолиз
	Глутаминсинтетаза	Синтез аминокислот, обмен аммиака
Кальций	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 исчерпанию уровня АТФ в клетке и нарушению клеточного мембранныго потенциала [1, 2]. Угнетение выработки АТФ вызывает повышение уровня в клетке АМФ, ГДФ и фосфора неорганического [8].

### **1.3 Особенности метаболизма костной ткани в норме и при патологии**

В морфофункциональном отношении кость является одной из наиболее сложных и биологически активных тканей. По многим показателям она превосходит другие системы организма и является наиболее массивной, многофункциональной, обладает высокой метаболической и репаративной активностью. Костная ткань в разных участках на 20–25 % состоит из органического матрикса. Около 60–65 % массы сухого деминерализованного матрикса приходится на коллаген и 17–18 % на неколлагеновые белки, по своей структуре, являющиеся гликопротеинами. В состав стромы костного мозга входят недифференцированные стволовые мезенхимальные клетки – ретикулярные, соединительнотканые, эндостальные фибробластоподобные, эндотелиальные клетки, адипоциты, дифференцированные костные клетки (остеобласти, остеокласти, остеоциты), межклеточное вещество, клетки эндоста и периоста, костный мозг, сосудистые, лимфатические и нервные образования, интимно связанные с окружающими мягкими тканями [13, 28, 36, 52].

Отличительной особенностью остеобластов является наличие мощного аппарата белкового синтеза. Метаболизм костной ткани состоит из двух противоположно направленных процессов - образования новой кости остеобластами и рассасывания старой кости остеокластами. В итоге общая

масса кости определяется соотношением интенсивности обоих названных процессов, протекающих в пределах участков обновления костной ткани.

Новообразование кости протекает в две стадии. Первая стадия определяется активностью остеобластов и предусматривает внутриклеточный синтез предшественников компонентов основного вещества (коллагена I типа, остеокальцина, сиалопротеинов и протеогликанов, а также щелочной фосфатазы). Многие из них в дальнейшем подвергаются посттрансляционной модификации, которая включает гидроксилирование пролина и лизина в составе проколлагена, гликозилирование щелочной фосфатазы и гидроксилизованных остатков в структуре коллагена и, наконец,  $\gamma$ -карбоксилирование остатков глютаминовой кислоты в молекуле остеокальцина. Затем вышеперечисленные вещества секретируются остеобластами во внеклеточное пространство, где и происходит сборка коллагеновых фибрилл. При этом под влиянием внеклеточной лизилксидазы образуются характерные для зрелого коллагена межфибриллярные сшивки - пиридинолиновые мостики. Процесс созревания основного вещества занимает 5–10 сут, после чего наступает вторая стадия - стадия минерализации основного вещества. По литературным данным губчатое вещество замещается каждые 3–4 года, а компактное вещество каждые 10 лет [49].

В состав кристаллов костной ткани входят гидроксиапатиты -  $\text{Ca}_0(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , которые имеют форму пластин или палочек. Кристаллы гидроксиапатита составляют лишь часть минеральной фазы образования костной ткани, другая часть представлена аморфным фосфатом кальция –  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Содержание аморфного  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  подвержено значительным возрастным колебаниям. Преобладающее его количество наблюдается в раннем детском возрасте. В зрелой костной ткани основным компонентом становится кристаллический гидроксиапатит. Обычно аморфный фосфат кальция рассматривают как лабильный резерв ионов кальция и фосфора. В

состав минеральной фазы кости входит значительное количество ионов, которые обычно не содержатся в чистом гидроксиапатите (например,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  и некоторые др.). Высказано предположение, что в кристаллической решетке гидроксиапатита кальций может замещаться другими двухвалентными катионами [50, 54].

Количество накопления фтора скелетом тесно связано с концентрацией фтора в питьевой воде, хотя на это повлияли бы большие отклонения от нормального уровня фтора в рационе. Многочисленные исследования установили, что фторид связывается внутри кости, замещая гидроксильные или бикарбонатные группы, обычно связанные со структурами гидроксиапатита, и это увеличивает кристалличность или кристаллическую структуру апатита. Также было доказано, что фторид неравномерно распределяется по всей кости, и наибольшая его концентрация обнаруживается на поверхности кости [70].

При хроническом флюорозе клетками-мишениями в костной ткани в первую очередь являются резорбирующие остеоциты, а также остеобlastы. Резорбирующие остеоциты становятся неактивны, что приводит к остеосклерозу. Это особенно ярко выражено в метафизах. Эпифизарная пластина оказывается зажатой между петрозаводными костями, и рост замедляется. Интерференция с резорбирующими остеоцитами во флюоротической кости характеризуется потерей двулучепреломления коллагена в такой кости. Недостаточность костной резорбции также приводит к задержке трабекулярной кости в коре. Токсическое действие фтора на остеоциты также может приводить к гибели клеток. Такой остеонекроз происходит в основном в гнатической кости. Наблюдалась атрофия остеобластов. Остеопения, таким образом, является следствием остеонекроза и остеопороза [49].

Хотя включение в костную ткань происходит мгновенно, оно увеличивается со временем, достигая максимального значения примерно через 4 ч с момента введения дозы. Кроме того, через 24 ч после введения дозы концентрация фтора в кости начинает снижаться благодаря процессу ремоделирования кости и физико-химическому фторидному обмену между кристаллитами и внеклеточной жидкостью [50, 63]. Процесс обмена фтора в костях протекает быстро и прекращается со смертью животного.

Другими словами, хотя кость имеет высокое сродство к фтору, поглощение зависит от метаболизма кости и количества фтора, которое достигает ткани. Поэтому, если количество фтора превышает способность ткани к поглощению, достигается плато, и дальнейшего увеличения инкорпорации не происходит. Это было обнаружено в отношении хронического воздействия фтора [51, 52].

#### **1.4 Особенности метаболизма почек в норме и при патологии**

Почки являются высоко метаболическими органами. В почках происходит превращение и синтез многих веществ необходимых для нормального функционирования организма (например превращение витамина D в его наиболее активную форму - витамин D3) [68].

Почки характеризуются самым высоким энергетическим обменом. АТФ образуется в почках в основном в реакциях аэробного окисления, интенсивность которых отражает потребление О<sub>2</sub>. При массе всего 0,5% от общей массы тела, почки потребляют 10% от всего поступившего в организм О<sub>2</sub>. При этом, в корковом веществе почек выражен аэробный процесс, в мозговом преобладает анаэробный. Основными субстратами для реакций аэробного окисления являются: жирные кислоты; кетоновые тела и глюкоза. Основной расход АТФ связан с процессами активного транспорта при реабсорбции, секреции, а также с биосинтезом белков [58].

Почки характеризуются высоким обменом белков. В почках образуется большое количество ферментов (ЛДГ, АСТ, АЛТ, ГДГ (или глутаматдегидрогеназы), глицин-амидинотрансферазы), синтезируются отдельные компоненты систем свертывания, фибринолиза и комплемента крови.

В почках наблюдается высокая активность протеолитических ферментов. Они участвуют в катаболизме белков с низкой молекулярной массой (5–6 кДа) и пептидов, которые фильтруются в первичную мочу. В клетках канальцев, под действием лизосомальных протеолитических ферментов эти белки и пептиды гидролизуются до аминокислот, которые идут на глюконеогенез или поступают в кровь [54, 59].

В почках активно происходит аммониогенез. Почки поглощают из крови много глутамина, который под действием глутаминазы гидролизуется с образованием амиака и глутамата. Глутаминаза почек значительно индуцируется при ацидозе, ингибируется при алкалозе. Глутаматдегидрогеназа дезаминирует глутамат до  $\alpha$ -кетоглутарата.

Амиак с протонами и анионами образует соли аммония (0,5 г/сут), которые выделяются с мочой. Этот процесс используется для регуляции кислотно-основного баланса и сохранения в организме важнейших катионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ .

Почки характеризуются высоким обменом углеводов. Большая активность аэробного гликолиза связана с интенсивным энергообменом. Активный пентозофосфатный шунт обеспечивает реакции антиоксидантной системы и микросомального окисления.

Почки являются важными регуляторами гомеостаза глюкозы в крови. Это происходит потому, что они не только активно реабсорбируют отфильтрованную глюкозу в кровоток, но и производят глюкозу через

глюконеогенез. Было подсчитано, что в пост-абсорбтивном состоянии почки отвечают за ~20-25% общего высвобождения глюкозы организмом, что делает почки ответственными за ~40% всего глюконеогенеза в организме [53]. De novo синтез глюкозы из жирных кислот также происходит в различных компартментах почек. Кроме того, глюкоза активно используется в качестве топлива в почках как по окислительному фосфорилированию, так и по гликолитическим путям [54].

1,25-диоксихолекальциферол (Витамин Д3) регулирует обмен фосфора, кальция и магния в организме. Поэтому при заболеваниях почек, может развиться остеодистрофия. В почках активно протекает  $\beta$ -окисление ЖК.

Уровни гликогена в почечной ткани обычно ничтожно малы. Накопление гликогена может быть результатом дефектов в ферментах, ответственных за синтез и расщепление гликогена, например при гипергликемии [55].

## **1.5 Особенности метаболизма печени в норме и при патологии**

Печень является центральным органом метаболизма, играющим также большую роль в развитии адаптивно-компенсаторных процессов, чем объясняется большое внимание к ней при изучении последствий различных неблагоприятных воздействий.

Печень играет уникальную роль в контроле углеводного обмена, поддерживая концентрацию глюкозы в нормальном диапазоне. Это достигается за счет жестко регулируемой системы ферментов и киназ, регулирующих либо расщепление глюкозы, либо ее синтез в гепатоцитах. Этот процесс находится под контролем глюкорегуляторных медиаторов, среди которых инсулин играет ключевую роль. [56, 67]. Нарушения углеводов и жиров могут привести к резистентности печени к инсулину. Метаболический дисбаланс может даже привести к опасным для жизни

состояниям. Поэтому очень важно поддерживать нормальную метаболическую функцию печени. Когда печень находится в патологическом состоянии, нарушается гомеостаз метаболизма печени, и метаболические нарушения еще больше усугубляют заболевание печени [69].

Важной функцией печени является липидный обмен. Потребление липидов, этерификация, окисление и секреция жирных кислот происходят в гепатоцитах. Печень также играет значительную роль в метabolизме сахара, который отвечает за образование и хранение глюкозы. После потребления пищи метаболизм глюкозы в печени приводит к быстрому переходу от синтеза глюкозы к хранению глюкозы и регулируется инсулином, ключевым регулятором [57, 64]. Инсулин способствует накоплению глюкозы, активируя гликогенсинтазу, которая опосредует синтез печеночного гликогена. Когда секреция инсулина недостаточна, синтез печеночного гликогена подавляется. Метаболизм сахара тесно связан с метаболизмом липидов. Инсулинорезистентность обычно сопровождается стеатозом печени. Когда возникает резистентность к инсулину, липолиз подавляется, а синтез липидов усиливается из-за эффекта гиперинсулинемии. Нарушение липидного обмена, особенно накопление внemаточных липидов, тесно связано с инсулинорезистентностью [58, 66].

Печень также играет центральную роль в качестве детоксицирующего органа по отношению к ксенобиотикам и химическим веществам. Одним из наиболее важных мест накопления фтора является печень, получающая 70% кровоснабжения из кишечного оттока. Печень является первой линией защиты от токсикантов, получаемых из кишечника. Длительное воздействие этого элемента стимулирует гепатоцеллюлярный некроз и апоптоз, дегенерацию тканей, воспаление и канцерогенез. Хроническое воздействие ионов фтора в процессе развития вызывает накопление этого элемента в печени и изменение активности НАД(Ф)Н-зависимых ферментов.

Длительное воздействие этого элемента токсично для печени и может вызвать нарушения ее гомеостаза [59].

Когда печень находится в патологическом состоянии, нарушаются гомеостаз метаболизма печени, и метаболические нарушения еще больше усугубляют заболевание печени [60, 69].

## **1.6 Характеристика НАД(Ф)Н – зависимых дегидрогеназ**

НАД(Ф)Н - зависимые дегидрогеназы – ферменты, принадлежащие к классу оксидоредуктаз, которые в качестве кофермента используют НАД и 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 инициирующую 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 (Г3ФДГ, КФ 1.1.1.8) осуществляет обратимое окисление глицеро-3-фосфата в диоксиацитонфосфат. 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 пировиноградную 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]. НАД- и НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназы контролируют метаболизм изоцитрата в ЦТК, превращая его в  $\alpha$ -кетоглутарат. Активность НАДИЦДГ отражает объем субстратного потока по циклу, который обеспечивает поддержание необходимой концентрации НАДН и энергетического потенциала митохондрий. При снижении интенсивности субстратного потока и недостатке водорода в митохондриях может включаться одна из

дополнительных реакций цикла, регулируемая НАДФИЦДГ; которая катализирует приток в цикл субстрата из цитозоля клетки [4, 16, 58].

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, почки и бедренная кость лабораторных мышей из вивария Сибирского Федерального Университета, кафедры медицинской биологии и лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ГУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН.

В научно-исследовательской работе было использовано 20 самцов лабораторных мышей: опытная группа – 10 половозрелых мышей (7 месяцев) и контрольная группа - 10 половозрелых мышей (7 месяцев). Опытную группу в течение 30 дней поили водой с фторидом натрия в концентрации 50 мг/л. Мы выбрали метод перорального введения фторида натрия, так как он отражает воздействие окружающей среды. Воздействие на мышей ионов фтора в питьевой воде с фторидом-натрия в дозе 50 мг/л основано на широко используемых моделях анализа фтор-токсичности, которые показывают, что для достижения эффекта, аналогичного наблюдаемому в организме человека, следует использовать в 5 раз более высокую концентрацию этого элемента у мышей. Согласно этой модели, доза 50 мг/л у мышей эквивалентна воздействию на человека концентрации фтора в питьевой воде в 10 мг/л [61]. 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**

Содержание фторид-иона определяли в печени и почках лабораторных мышей.

Перед началом проведения измерений образцы следует подготовить. На электронных весах отвешивали 0,2 г органа, затем добавляли по 1 мл концентрированной азотной кислоты и оставляли в холодильнике на 12 часов при температуре + С. Пробы сжигали при 1200 С в течение 20 мин. После охлаждения pH проб доводили до 3 цитратом натрия (1,5 М, pH=5,25). Содержание фторид-иона в пробах определяли с помощью фторселективного электрода и выражали в мг/кг.

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 фторидселективного 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  $\text{Al}^{3+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$  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 мембранны 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 ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), 102,06 г ацетата натрия ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) 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 pH 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 ( $pF$ ). Потенциал ионоселективного 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 Биолюминесцентное определение активности НАД(Ф)- зависимых дегидрогеназ в гомогенате печени и почек**

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 бидистилированной воды, полученный гомогенат центрифугировали при 400 g в течении 10 мин. Супернатант пропускался через марлевый фильтр, полученный гомогенат замораживали. Полученные образцы использовали для биолюминесцентного анализа.

Биолюминесцентное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ проводится по ранее разработанным методикам [37]. Для этого гомогенат органа (разведение в 16 раз). После однократного замораживания-размораживания орган разрушали путем осмотического лизиса с добавлением дистиллированной воды (1:5 по объему) и 1,0–2,0 mM 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. Конкретные значения концентраций субстратов и кофакторов, а также pH 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 mM соответственно. В среду инкубации для определения уровней НАДНГДГ и НАДФНГДГ дополнительно вносили NH<sub>4</sub>Cl в концентрации 5,0 mM, а для определения ГР – ЭДТА в концентрации 0,5 mM.

После инкубации исследуемых проб при 37оС 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 флавинмононуклеотида (ФМН) в концентрации  $1,5 \times 10^{-5}$  М, 50 мкл 0,0005% миристинового альдегида и 10 мкл ферментативной системы НАД(Ф)Н: ФМНоксидоредуктаза-люцифераза (все реагенты биолюминесцентной системы разведены в 0,1 М К<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>-фосфатном буфере с pH 7,0).

После смешивания биолюминесцентных реагентов 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 leiognathid* и оксидоредуктазы из *Vibrio fishery* в Институте биофизики СО РАН г. Красноярска. Необходимо учесть, что в разрушенных клетках присутствует некое количество субстрата для работы исследуемых ферментов. Поэтому мы определяли показатели, названные «субстратный фон ферментов» [36].

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 реагенты в концентрациях указанных выше, после чего производилось измерение интенсивности биолюминесценции. В связи с широким диапазоном pH буферов, используемых для определения дегидрогеназной активности, а

также pH-зависимостью биолюминесценции ферментативной системы, калибровочные графики строились для каждого pH буфера [37, 48].

Таблица 2 - Концентрация субстратов, кофакторов и показатели pH среды для определения активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в гомогенате печени и почек 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-HCl буфере; с pH 7,0, 7,4 и 7,8 – на K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>-fosфатном буфере.

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

A – 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:

где:

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

A – активность фермента;

C<sub>бел</sub> – количество белка в пробе [48].

## 2.5 Определение содержания общего белка в гомогенате печени и почек

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

Таблица 3 - Схема внесения реагентов в пробирки для определения общего белка в гомогенате печени и почек

Отмерить, мл	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная проба
Гомогенат	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 реагенты 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:

,

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

Ео – оптическая плотность опытной пробы, ед.опт.плотн.;

Ек – оптическая плотность калибровочной пробы, ед.опт.плотн.;

60 – концентрация общего белка в калибровочном растворе, г/л [36, 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 (Мe) и интерквартальный разброс в виде подсчета 25- (C25) и 75-перцентилей (C75). Проверку гипотезы о статистической достоверности двух выборок проводили непараметрическим методом с помощью критерия Манна-Уитни. Различия считались статистически значимыми при  $p \leq 0.05$  [13].

Результаты статистической обработки сведены в таблицы и представлены на графиках.

### **3 Результаты и обсуждения**

#### **3.1 Анализ содержания фторид-ионов в бедренной кости, печени и почках лабораторных мышей**

[изъято 2 страницы]

#### **3.2 Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в гомогенате печени**

[изъято 7 страниц]

#### **3.3 Активность НАД(Ф)- зависимых дегидрогеназ в гомогенате почек**

[изъято 5 страниц]

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

1. Обнаружено достоверное увеличение концентрации ионов фтора в 3,8 раза в бедренной кости, в 2,8 раза печени и в 1,6 раз почках лабораторных мышей по сравнению группой контроля.
2. В гомогенате печени лабораторных мышей, подвергшихся фтористой интоксикации обнаружено достоверное повышение активности Г6ФДГ и ГР и снижение активности ЛДГ, НАДФГДГ, НАДГДГ и НАДИЦДГ.
3. В гомогенате почек лабораторных мышей, подвергшихся фтористой интоксикации обнаружено достоверное повышение активности Г6ФДГ, Г3ФДГ, МДГ, НАДФИЦДГ и НАДФМДГ, а также снижение активности ЛДГ.

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АФК – активные формы кислорода  
АТФ – аденоzin-5'-трифосфат  
АДФ – аденоzin-5'-дифосфат  
Г3ФДГ – глицерол-3-фосфатдегидрогеназа  
Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа  
ГДГ – глутаматдегидрогеназа  
ГР – глутатионредуктаза  
ЛДГ – лактатдегидрогеназа  
МДГ – малатдегидрогеназа  
НАД<sup>+</sup> – никотиамиадениндинуклеотид окисленный  
НАДН – никотинамиадениндинуклеотид восстановленный  
НАДФ<sup>+</sup> – никотинамиадениндинуклеотидфосфат окисленный  
НАДГДГ – НАД-зависимая глутаматдегидрогеназа  
НАДИЦДГ – НАД-зависимая изоцентратдегидрогеназа  
НАДФИЦДГ – НАДФ-зависимая изоцетратдегидрогеназа  
НАДФМДГ – НАДФ-декарбоксилирующая малатдегидрогеназа (малик-фермент)  
НАДФГДГ – НАДФ-зависимая глутаматдегирогеназы  
НАДНГДГ – НАДН-зависимая реакция глутаматдегирогеназы  
НАДНМДГ – НАДН-зависимая реакция малатдегидрогеназы  
НАДФНГДГ – НАДФ-зависимая реакция глутаматдегидрогеназы  
НАДФН – никотиамиадениндинуклеотидфосфат восстановленный  
ПДК – предельно допустимая концентрация  
ЦТК – цикл трикарбоновых кислот

## **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. Эколо-экономическая эффективность процессов производства в алюминиевой промышленности (на примере Красноярского алюминиевого завода): автореф. дис. канд. экономич. Наук: 08.00.05 / Дампилон Жаргал 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 цеолитовогоэнтеросорбента на ультраструктуру печени /Гайдаш А.А., Цуканов В.В. // Гепатология. – 2005. – № 5. – С.24–28.
20. Crenshaw, M.A. Fluoride incorporation into developing enarr 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 off 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-Stępniaak, I. Effect of exposure to fluoride and acetaminophenb on oxidative/nitrosative status of liver and kidney in male and female rats / Inkielewicz-Stępniaak 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. 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. Хаземова, Л.А. К вопросу унификации методов определения фтора в объектах окружающей среды / Л.А. Хаземова, 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 2016.– 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 / Линаева 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., Высокочувствительное определение активности дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови биолюминесцентным методом / А. А. Савченко, Л. Н. Сунцова // Лаб. дело. – 1989. – № 11. – С. 23–25.
38. Савченко, А.А., Определение активности NAD(P)- зависимых дегидрогеназ в нейтрофильных гранулоцитах биолюминесцентным методом / А. А. Савченко // Бюл. экспериментал. биологии и медицины. – 2015. – Т. 159. – № 5. – С. 656–660.

39. Березов, Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М.: Медицина, 1998. – 704 с.
40. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О. Ю. Реброва. – М.: Медиасфера, 2003. – 305 с.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. Catcott, E. J. Air pollution. Effect of air pollution on animals: monograph / E.J. Catcott // World Health Organization, 1961. – P. – 221.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. Савченко, А. А. Основы клинической иммунометаболомики / А. А. Савченко, А. Г. Борисов. – Новосибирск: Наука, 2012. – 263 с.

49. Maylin G. A. Industrial fluoride pollution. Chronic fluoride poisoning in Cornwall Island cattle / G. A. Maylin [et al.] // Cornell Vet. – 1979. – № 8. – P. 1–70.
50. Robinson, J. Kirkham, J.A. Weatherell, Fluoride in teeth and bone / J. Robinson, J.A Kirkham, [et al.] // Fluoride in Dentistry. – 1996. – P. 69–87.
51. J.A. Cury, Fluoride metabolism in rats during successive pregnancies / J.A. Cury [et al.] // Faculty of Dentistry of Piracicaba, State University of Campinas. – 1984. – P. 136.
52. Rao, H.V. Beliles, R.P. Whitford, G.M. A physiologically based pharmacokinetic model for fluoride uptake by bone / H.V. Rao, R.P. Beliles, [et al.] // Reg. Toxicol. Pharmacol. – 1995. – P. 30–42.
53. Герих, Ю. Е. Физиология гомеостаза глюкозы / Ю. Е. Герих // Анатомия и физиология гомеостаза. – 2000. – № 2. – С. 345–350.
54. Alsahli M., Gerich J.E. Renal glucose metabolism in normal physiological conditions and in diabetes / M. Alsahli, J.E. Gerich // Diabetes Res Clin Pract. – 2017– № 133. – P. 1–9.
55. Sullivan, M.A. Forbes, J.M. Glucose, and glycogen in the diabetic kidney: Heroes or villains? / M.A. Sullivan, J.M. Forbes // J. BioMedicine. – 2019. – № 47. – P. 590-597.
56. Raddatz, D. Ramadori, G. Carbohydrate metabolism and the liver: actual aspects from physiology and disease / D. Raddatz [et al.] // J.Gastroenterol. – 2007. – № 45. – P. 51-62.
57. Petersen, K. F. Laurent, D. Rothman, D. L. Cline, G. W. Mechanism by which glucose and insulin inhibit net hepatic glycogenolysis in humans / K. F. Petersen, Laurent D. [et al.] // The Journal of Clinical Investigation. – 1998. – № 101. – P. 1203–1209.
58. Samuel, V. T. Liu, Z.-X. Qu, X. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease / V. T. Samuel [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 2004. – № 279. – P. 3234–3235.

59. Dec, A. I. Baranowska-Bosiacka, A. Pilutin, D. Maciejewska, K. Pre-and postnatal exposition to fluorides induce changes in rat's liver morphology by impairment of antioxidant defense mechanisms and COX induction / A. I. Dec, A. Baranowska-Bosiacka [et al.] // Chemosphere. – 2018. – P. 211.
60. Ding, H.R. Wang, J.L. Ren, H.Z. Shi, X.L. Lipometabolism and Glycometabolism in Liver Diseases / H.R. Ding, J.L. Wang [et al.] // The Journal of Biomed. – 2018. – P. 72.
61. Dec, K. Lukomska, A. Skonieczna-Zydecka, K. Chronic exposure to fluoride affects GSH levels and NOX4 expression in the Rat model of this neurotoxicity element / K. Dec, A. Lukomska [et al.] // Biomolecules. – 2020. – №10. – P. 422.
62. Chinoy, N.J. Mice treated with sodium fluoride. / N.J. Chinoy [et al.] // Fluoride. – 1999. – № 3. – P. 162 – 170.
63. Chinoy, N. J. Amelioration of fluoride toxicity by vitamins E and D in reproductive functions of male mice / N. J. Chinoy and Arti Sharma // Fluoride. – 1999. – № 32. – P. 45.
64. Chinoy, N. J. Reversal of fluoride-induced alterations in cauda epididymal spermatozoa and fertility impairment in male mice / N. J. Chinoy [et al.] // International Society for Fluoride Research. – 1998. – P. 34.
65. Chinoy, N. J. Ultrastructural and histopathological changes in ovary and uterus of fluorotic mice and reversal by some antidotes / N. J. Chinoy and D. Patel // International Society for Fluoride Research. –1998. – № 3. – P. 7.
66. Dote, T Dose response relationship between intravenous administration of sodium fluoride and acute renal damage in rats. / T. Dote, K. Kono, H. Nishiura [et al.] // Fluoride. – 1998. –№ 3. – P. 21.
67. Sharma, A. Role of free radicals in fluoride-induced toxicity in liver and kidney / A. Sharma [et al.] // International Society for Fluoride Research. – 1998. – № 3. – P. 15.

68. Kai-tai, L. Adverse effects of combined arsenic and fluoride on liver and kidney in rats / L. Kai-tai, W. Guo-Quan, M. Li-Ying[et al.] // Fluoride. – 1999. – № 4. – P. 243 – 247.
69. Лелевич, С.В. Влияние хронического введения этанола на углеводный обмен в печени крыс / С.В. Лелевич // Актуальные вопросы гепатологии. –2011. – С. 116–118.
70. Лисецкая, Л.Г. Влияние фтористой нагрузки на баланс некоторых элементов и состояние зубочелюстной системы / Л.Г. Лисецкая, А. И. Кучеренко, В. Ю. Лебединский // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2008. – № 3. – С. 41.
71. Grucka-Mamczar, E. Birkner, E. Stawiarska-Pięta, B. Dulian, H. Activities of some enzymes and concentration of ammonia in serum of rats with fluoride hyperglycemia / E. Grucka-Mamczar, E. Birkner [et al.] // Acad. Med. Stet. – 2004. – № 50. – P. 36–41.
72. Dimcevici Poesina, N. Balalau C. Barca M. Testicular histo-pathological changes following sodium fluoride administration in mice / N. Dimcevici Poesina [et al.] // The Journal Morphol Embryol. – 2013;54(4):1019- 1024. 68.
73. Zhao MX, Zhou GY, Zhu JY, et al. Fluoride exposure, follicle stimulating hormone receptor gene polymorphism and hypothalamus- pituitary- ovarian axis hormones in Chinese women. Biomed Environ Sci. 2015. – № 28. – P. 696–700.
74. Wang, H.W. Zhao, W.P. The MMP- 9/TIMP- 1 system is involved in fluoride- induced reproductive dysfunctions in female mice / H.W. Wang [et al.] // Biol Trace Elem Res. – 2017. – № 178. – P. 253- 260.
75. Wang, H.W. Zhao, W.P. Liu, J. Fluoride- induced oxidative stress, and apoptosis are involved in the reducing of oocytes development potential in mice / H.W. Wang [et al.] // Chemosphere. – 2017. – № 186. – P. 911- 918.

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
  
подписьинициалы, фамилия  
« 21 » июня 2021г.

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Изучение метаболического статуса при воздействии фторида натрия *invivo*

06.04.01 Биология  
06.04.01.05 Реконструктивная биоинженерия

Научный руководитель

  
подпись, дата

доцент, к.б.н.

должность, ученая  
степень

Ю. С. Акопова

инициалы, фамилия

Выпускник

  
подпись, дата

Е. П. Устинова

инициалы, фамилия

Рецензент

  
подпись, дата

доцент, к.б.н.

должность, ученая  
степень

И.С. Коротченко

инициалы, фамилия

Красноярск 2021