

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 .

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 - Биология

Особенности метаболизма почечной ткани *in vivo* при хронической  
интоксикации фторидами

Руководитель \_\_\_\_\_ доцент, к.б.н.  
подпись, дата должность, ученая степень

Ю.С. Аكوпова  
инициалы, фамилия

Выпускник \_\_\_\_\_  
подпись, дата

Рогачева Т.А.  
инициалы, фамилия

Красноярск 2021

## Содержание

ВВЕДЕНИЕ .....	3
1 Обзор литературы .....	6
1.1 Роль фтора в организме человека и животных .....	6
1.1.1 Физико-химические свойства фтора .....	10
1.1.2 Дефицит фтора .....	11
1.1.3 Влияние высоких концентраций фтора на организм человека и животных .....	12
1.1.4 Предельно допустимые концентрации фтора .....	14
1.2 Морфофункциональные особенности почек .....	14
1.2.1 Особенности метаболизма почечной ткани .....	17
1.2.2 Влияние соединений фтора на проницаемость клеточных мембран .....	20
1.2.3 Характеристика НАД(Ф)Н - зависимых дегидрогеназ .....	21
1.2.4 Возрастные морфологические особенности почек лабораторных мышей .....	23
2 Материалы и методы .....	24
2.1 Объект исследования .....	24
2.2 Потенциометрический метод определения ионов фтора с использованием ионоселективного электрода .....	24
2.3 Биoluminesцентное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в гомогенате почки .....	26
2.4 Определение содержания белка .....	31
2.5 Статистические методы исследования .....	32
3 Результаты и обсуждения .....	33
3.1 Анализ содержания ионов фтора в почках лабораторных мышей .....	33
3.2 Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в гомогенате почек .....	34
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	38
Список сокращений .....	39
Список использованных источников .....	40

## ВВЕДЕНИЕ

Среди обширной группы профессиональных заболеваний патология почек и мочевыводящих путей занимает относительно скромное место. Известно большое число самых разнообразных агентов (химических, физических и пр.), которые при длительном воздействии, наряду с клинически выраженными основными признаками интоксикации, оказывают повреждающее воздействие на выделительную систему. Информация по вопросам нефротоксичности фтора малочисленна, является достаточно разрозненной и неоднозначной, поскольку механизмы действия фтора многогранны и порой непредсказуемы [1, 4, 6]. Вместе с тем большинство авторов считают, что фтор активен только в отношении высокоминерализованных тканей, прежде всего костной. Системность поражения при хронической фтористой интоксикации (ХФИ) позволяет проследить за изменениями в одной из важнейших систем поддержания гомеостаза – системе регуляции водно-солевого равновесия, эффекторным органом которой являются почки. Известно, что фтористая интоксикация сопровождается, прежде всего, нарушением почечных функций, так как большая часть фторидов (от 60 до 87 %) экскретируется с мочой.

Одной из важных медико-биологических проблем является выяснение физиологических и молекулярных механизмов влияния неблагоприятных повреждающих факторов на организм, в том числе, фтора и его соединений, в частности фторида натрия. Решение этой проблемы имеет важное теоретическое и практическое значение для понимания внутриклеточных защитных механизмов организма. Пристальное внимание к различным аспектам биологического влияния фтора на организм обусловлено широким распространением этого галогена в природе. В физиологических концентрациях он необходим для нормального роста и развития организма, где выполняет свою специфическую метаболическую функцию не только в минерализующихся, но и в других тканях [1]. Важным является изучение воздействия субхронического 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. 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. паргазообразных и твердых примесей, из них с содержанием фтора – 4 тыс. 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 почек у лабораторных мышей в условиях хронической интоксикации.

Исходя из цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести сравнительный анализ содержания фторидов в гомогенате почек юных и половозрелых лабораторных мышей из контрольной и опытной групп.
2. Сравнить уровни активностей НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в гомогенате почек юных лабораторных мышей из контрольной и опытной групп.
3. Изучить активности оксидоредуктаз в гомогенате почек половозрелых лабораторных мышей в контрольной и опытной группах.
4. Оценить возрастные изменения в активностях оксидоредуктаз для контрольной и опытной групп.

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  $OH^-$  в трансформированном минерале. *In vivo* преобладает второй из этих процессов, особенно у взрослых. Реакция замещения образует смешанную форму апатита, которая соответствует формуле  $Ca_5F(PO_4)_3$ . Содержание фтора в костной и зубной эмали составляет 0,05 моль / кг и указывает на соотношение  $OH^-$  к фтору в молекуле апатита как 40: 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, постстрематическую, фосфатазу, активируют аденилатциклазу [17,18, 19].

В организме фтор вместе с кальцием и фосфором формирует и укрепляет костный скелет и зубную эмаль, обеспечивает нормальный рост волос и ногтей, стимулирует процессы кроветворения, укрепляет иммунитет, способствует выводу из организма солей тяжелых металлов и радионуклидов, предупреждает развитие остеопороза. Благодаря способности клеток костной ткани быстро связывать избыток фтора и мобилизовать во внеклеточную жидкость при дефиците осуществляется регуляция концентрации фтора в организме. Известно, что низкие концентрации фтора необходимы для нормального роста и развития организма.

Фтор оказывает регуляторное влияние не только на клетки костной ткани (остеобласты и остеокласты), но и на клетки эндотелия, печени, почек, миокарда и нервной системы. Фтор может играть существенную роль не только в начальных стадиях минерализации твердых тканей, но и предупреждать их деминерализацию. При кариесе зубов и остеопорозе минеральная часть костной ткани растворяется под воздействием кислот. В первом случае кислая среда создается бактериями, населяющими поверхностные слои эмали, а во втором – остеокластами и другими костными клетками, резорбирующими минеральные компоненты кости.

Достоверно известно, что фтор придает кристаллам фторапатита большую упорядоченность, снижая тем самым их растворимость при физиологическом значении pH. Вместе с тем, поскольку экзогенный фтор

замещает гидроксил-ион в преобразованных кристаллах гидроксилapatита, то это замещение происходит в первую очередь в наружных слоях эмали толщиной 1-5 мкм, что снижает их растворимость даже при незначительном общем повышении концентрации фтора в зубах.

В настоящее время вопрос о биогенном влиянии фтора на клеточном уровне остается открытым, поскольку необходимое его количество находится близко к дозе, вызывающей повреждающее действие. Известно, что эффекты фтора на физиологические функции организма и клеточный метаболизм зависят от типа клеток, концентрации и времени действия. Так, например, в костной и зубной тканях фтор в микромолярных концентрациях вызывает клеточную пролиферацию и рост, тогда как в миллимолярных – подавляет пролиферацию и индуцирует апоптоз клеток.

Фтор присутствует в питьевой воде, зубной пасте, а также 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, горнорудная и деревообрабатывающая промышленности.

Токсичность соединений фтора обуславливается его способами поступления в организм, а также 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. Достоверно известно, 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, известно, что фторид



натрия снижает активность супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы в клетках печени мышей.

Имеются морфологические исследования, свидетельствующие о согласованных изменениях в гипоталамо-нейросекреторной системе, аденогипофизе и коре надпочечников при интоксикации фтором. Показано снижение морфофункциональной активности коры надпочечников и аденогипофиза, что может проявляться угнетением секреции гормонов гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС). Результатом такой гормональной перестройки является развитие метаболической недостаточности в тканях [2, 3]. Показано, что при фтористой интоксикации повышается функциональная активность основных клеток паращитовидных желёз и С-клеток щитовидной железы [24, 37]. В результате этого повышается уровень гормонов, регулирующих гомеостаз  $Ca^{2+}$  в организме – паратиреоидного гормона (ПТГ) и кальцитонина. При этом секреция ПТГ в ответ на фтористую интоксикацию была избыточной – уровень этого гормона в крови экспериментальных крыс превышал контрольные значения в 5 раз.

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 [25]. Длительное действие фтора приводит к изменению содержания в крови тиреотропного гормона (ТТГ) и гормонов щитовидной железы – трийодтиронина (Т3) и тироксина (Т4). При этом динамика уровня этих гормонов зависит от продолжительности действия повреждающего фактора.

Первая фаза характеризуется повышением в крови уровня как ТТГ, так и Т4, на фоне сниженного содержания Т3. Затем уровень ТТГ и гормонов щитовидной железы возвращается к контрольным значениям, а по мере продолжительности действия повреждающего фактора наступает фаза угнетения, характеризующаяся снижением уровня ТТГ, Т4 и Т3 [35, 38]. Гормоны щитовидной железы регулируют окислительно-восстановительные процессы и основной обмен, в результате чего обеспечивают более интенсивное функционирование всего организма в условиях действия повреждающего фактора.

Таким образом, при фтористой интоксикации наблюдаются разнонаправленные изменения в содержании важных адаптивных гормонов в крови – гормонов ГГНС, ТТГ, Т3, Т4, ПТГ, кальцитонина и др.

При этом фазовые изменения в содержании этих гормонов отражают компенсаторную реакцию организма в ответ на длительное действие соединений фтора. В частности, может изменяться активность ферментов, ответственных за поддержание метаболизма в организме на физиологическом уровне [46, 47].

Доказано, что соединения фтора обладают высоким сродством к некоторым ионам металлов, играющих роль кофакторов в активности ферментов основных метаболических путей. В большинстве случаев фтор действует как ингибитор ферментов, но иногда он может стимулировать их активность. Механизмы зависят от типа фермента, концентрации и длительности действия фтора [1, 3]. Так, в микромолярных дозах фтор считается эффективным анаболическим агентом, в то время как миллимолярные концентрации ингибируют различные ферменты, включая и фосфатазы.

### **1.1.1 Физико-химические свойства фтора**

Атомы фтора обладают очень высокой электроотрицательностью, то есть способностью притягивать электроны. Этот элемент является наиболее электроотрицательным из числа всех известных на Земле химических элементов; это характеризует его как химический самый активный элемент, образующий многочисленные соединения, часть из которых опасны для здоровья людей и животных. Поэтому в списке вредных веществ фтор относится к 1 классу опасности в почве и ко 2-му классу в воде.

Чистый фтор настолько агрессивен, что соприкосновение с ним кожи человека всего в течение 2 секунд приводит к появлению ожога второй степени, вода в атмосфере фтора горит синим пламенем, а платина сгорает как порох. При контакте фтора с водородом даже при температуре  $-252^{\circ}\text{C}$  (близкой к абсолютному нулю), происходит мощный взрыв. В обычных условиях фтор – бледно-желтый газ, при температуре  $-188^{\circ}\text{C}$  – жидкость канареечно-желтого цвета, при  $-228^{\circ}\text{C}$  фтор замерзает и превращается в светло-желтые кристаллы. Если температуру понизить до  $-252^{\circ}\text{C}$ , эти кристаллы обесцветятся. Запах фтора – резкий и раздражающий – напоминает одновременно запахи хлора и озона. Одной миллионной доли фтора в воздухе достаточно, чтобы человеческий нос уловил его присутствие. Токсичность соединений фтора зависит от способа поступления в организм и физико-химических свойств соединений.

Особое значение имеет растворимость. Высокорастворимые соединения токсичнее после перорального поступления, чем малорастворимые или нерастворимые. В организме фтор вместе с кальцием и фосфором формирует и укрепляет костный скелет и зубную эмаль, обеспечивает нормальный рост волос и ногтей, стимулирует процессы кроветворения, укрепляет иммунитет, способствует выводу из организма солей тяжелых металлов и радионуклидов, предупреждает развитие остеопороза.

Кость играет важную роль в регуляции концентрации фтора во внеклеточной жидкости благодаря способности быстро связывать его избыток и мобилизовать во внеклеточную жидкость при дефиците. При уменьшении рН концентрация фтора снижается. Фтор, соединяясь с гидроксиапатитом, образует фторапатит, хотя на его долю приходится лишь 1/40 часть апатита, тем не менее, именно его присутствие придает кислотоустойчивость и прочность зубам и костям. Фториды способствуют фиксации кальция в твердых тканях и их минерализации, ингибируют липазы, эстеразу, ЛДГ, активируют аденилилциклазы, стимулируют кроветворение, нарушают брожение углеводов в полости рта и уничтожают кариогенные бактерии. Установлено, что фториды ингибируют ферменты: енолазу, фосфоглюкомутазу, фосфотазу.

### **1.1.2 Дефицит фтора**

Фтор обнаруживает выраженную избирательность к твердым тканям и принимает участие в начальных этапах их минерализации. В то же время никаких нарушений этого процесса у подопытных животных, содержащихся на дефицитном по фтору рационе в течение нескольких поколений подряд, обнаружить не удалось, так же, как и добиться снижения его концентрации в костях ниже уровня, необходимого, согласно теоретическим расчетам, для наступления процесса минерализации. (0,01— 0,1 мкмоль/л).

Фтор обладает высоким сродством к белку матрикса эмали и, включаясь в эмаль зубного зачатка еще до начала его минерализации, может способствовать формированию центров кристаллизации (нуклеации) апатита [20]. К появлениям недостаточности фтора большинство исследователей относят остеопороз и кариес зубов, имеющих весьма сложную природу. Предупреждение их возможно как при недостаточности, так и избытке фтора. Таким образом, имеющиеся в настоящее время данные дают основание рассматривать явно выраженный

защитный эффект фтора при этих заболеваниях скорее, как результат фармакологического, а не физиологического действия этого микроэлемента. Несмотря на эти сомнения, в медицине распространена точка зрения, что именно кариес зубов является наиболее известным маркером гипопародонтоза у человека.

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

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

В избыточных концентрациях фториды токсичны. Симптомы, проявляющиеся при всасывании избытка препаратов 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, то в качестве противоядия используют кальций – молоко или известковую воду. Если доза превышает эту величину, необходима госпитализация.

Токсическое воздействие фторидов гораздо чаще наблюдается при длительном хроническом воздействии на организм человека. При избыточном содержании фторидов развивается хроническая фтористая интоксикация — флюороз. У лиц, которые никогда не работали на заводе, но проживали по близости в течении 5 лет отмечают высокое содержание фтора в волосах и ногтях, а также 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, сердечно-сосудистая и 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 многообразных нарушений, касающихся всех систем жизнеобеспечения.

Количество фтора не должно превышать наших естественных потребностей, поскольку избыток этого вещества гораздо более опасен, чем его недостаток. Фтор – это олигоэлемент вулканического происхождения. В организме животных и людей он содержится, в частности, в зубной и костной ткани. Массовая реклама выдает недостаток фтора как опасность для организма, в частности зубов. Систематическое добавление фтора в питьевую воду для профилактики кариеса стало обычной практикой. Потребовались годы, чтобы уже в наши дни выяснить, что добавление в пищу фтора никоим образом не способствует предотвращению кариеса, основной причиной возникновения которого является неправильное питание. Бесконтрольное употребление фтора не ликвидирует проблемы с кариесом, но представляет опасность для здоровья, поскольку фтор разрушает каталазы.

Каталазы – группа ферментов, защищающих организм от агрессивного действия свободных радикалов. Известно, что свободные радикалы разрушают клетки, угрожая целостности ДНК и вызывая мутации в процессе воспроизведения клеток. Цепная реакция клеточных мутаций может спровоцировать серьезные заболевания, в частности, формирование раковых опухолей. Научные исследования показали, что существует связь между синдромом Дауна и фторированием воды, поскольку некоторые ферменты мозга чувствительны к ингибирующему воздействию избытка фтора. Беременные женщины особенно подвержены подобным воздействиям, поскольку избыток фтора в питьевой воде проникает в кровь матери, а затем, через плаценту, в кровь зародыша. При этом содержание фтора в плаценте прямо пропорционально его содержанию в воде.

Фторирование воды происходит посредством добавления в нее фторида натрия, который является крайне токсичным веществом для организма. Однако эта процедура все еще весьма распространена и очень популярна во всем мире. Поэтому потребитель должен сам позаботиться о своем здоровье и принимать необходимые меры предосторожности при использовании питьевой воды. Избыток фтора в питьевой воде попадает в кровь матери, а затем в кровь плода.

### **1.1.4 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].

## **1.2 Морфофункциональные особенности почек**

У человека почки расположены за пристеночным листком брюшины в поясничной области по бокам от двух нижних грудных и двух верхних поясничных позвонков в проекции которых прилегают к задней брюшине, причём правая почка в норме расположена несколько ниже, поскольку сверху она граничит с печенью (у взрослого верхний полюс правой почки обычно достигает уровня 12-го межреберья, верхний полюс левой — уровня 11-го ребра).

Почка - парный выделительный орган, принимает участие в регуляции водно-электролитного баланса, поддерживает кислотно-щелочной баланс, выделение азотистых соединений, поддерживает осмотическое давление жидкостей организма, регуляцию артериального давления.

Почка имеет гладкую поверхность бобовидной формы, длина каждой почки 10-12 см, масса 150-160 гр. Верх почки покрыт плотной соединительнотканной капсулой. В среднем отделе есть почечные ворота - впадины, в которых впадают почечная артерия и нервы, а выходят почечная вена, лимфатические протоки и мочеточники. Фиксируется почка с помощью жировой капсулы, фасции и внутрибрюшного давления.

В тканях почек выделяют два слоя: внешний - корковый и внутренний - мозговой. Структурно-функциональная единица почки - нефрон. В обеих почках человека около двух миллионов нефронов. В нефроне имеются мальпигиевы тела, состоящие из двух слоев клубочковой капсулы (капсула Шумлянского - Боумана) и системы канальцев нефрона. От капсулы отходит клубочковый почечный каналец, который находится в корковом слое, является проксимальной частью канальца нефрона и входит в петлю нефрона (петлю Генле). В петле есть восходящая и нисходящая части. Восходящая часть идет к дистальному канальцу нефрона, впадающему в собирательные протоки почек. Несколько собирающих протоков попадают в сосочковые протоки, открывающиеся в чашечку почки. Почки в минуту прокачивают через себя около 1 литра крови, отфильтровывают продукты разложения, токсины и отходы, а затем плазма направляет ее в мочеточники, мочевой пузырь, из которого они выводятся. Через почки человека проходит более 200 литров крови.

Основной функцией почек является выведение из организма воды и водорастворимых веществ (конечных продуктов обмена веществ). С экскреторной функцией тесно связана функция регуляции ионного и кислотно-основного равновесия внутренней среды организма. Обе функции контролируются гормонами. Кроме того, почки выполняют эндокринную функцию, принимая непосредственное участие в синтезе многих гормонов. Наконец, почки участвуют в процессах промежуточного метаболизма, особенно в глюконеогенезе и расщеплении пептидов и аминокислот. Через почки проходит очень большой объем крови: 1500 л в сутки. Из этого объема отфильтровывается 180 л первичной мочи. Затем объем первичной мочи существенно снижается за счет реабсорбции воды, в итоге суточный выход мочи составляет 0,5-2,0 л.

Процесс мочеобразования в нефронах складывается из трех этапов. Ультрафильтрация (гломерулярная или клубочковая фильтрация). В клубочках почечных телец из плазмы крови в процессе ультрафильтрации образуется первичная моча, изоосмотическая с плазмой крови. Поры, через которые фильтруется плазма, имеют эффективный средний диаметр 2,9 нм. При таком размере пор все компоненты плазмы крови с молекулярной массой ( $M$ ) до 5 кДа свободно проходят через мембрану. Вещества с  $M < 65$  кДа частично проходят через поры, и только крупные молекулы ( $M > 65$  кДа) удерживаются порами и не попадают в первичную мочу. Так как большинство белков плазмы крови имеют достаточно высокую молекулярную массу ( $M > 54$  кДа) и заряжены отрицательно, они

удерживаются гломерулярной базальной мембраной и содержание белков в ультрафильтрате незначительно.

Первичная моча концентрируется (примерно в 100 раз по сравнению с исходным объемом) за счет обратной фильтрации воды. Одновременно по механизму активного транспорта в канальцах реабсорбируются практически все низкомолекулярные вещества, особенно глюкоза, аминокислоты, а также большинство электролитов (неорганических и органических ионов). Реабсорбция аминокислот осуществляется с помощью группоспецифичных транспортных систем (переносчиков), с дефектом которых связан ряд генетически обусловленных наследственных заболеваний (цистиноз, глицинурия, синдром Хартнупа). Большинство веществ, подлежащих выведению из организма, поступают в мочу за счет активного транспорта в почечных канальцах. К таким веществам относятся ионы  $\text{H}^+$  и  $\text{K}^+$ , мочева кислота и креатинин, лекарственные вещества, например пенициллин.

Процессы концентрирования и селективного транспорта в почках требуют больших затрат энергии. Необходимый АТФ синтезируется за счет окисления жирных кислот, кетоновых тел и некоторых аминокислот и в меньшей степени лактата, глицерина, цитрата и глюкозы, которые содержатся в крови. В почках так же, как и в печени, может идти процесс глюконеогенеза. Субстратами служат углеродные скелеты глюкогенных аминокислот, азот которых в форме аммиака используется для регуляции рН мочи.

В почках обнаружены ферменты расщепления пептидов и метаболизма аминокислот, обладающие высокой активностью (например, оксидазы аминокислот, аминоксидазы, глутаминаза). Вода и электролиты свободно проходят через базальную мембрану, а вещества с более высокой молекулярной массой фильтруются избирательно. Определяющим фактором для фильтрации средне- и высокомолекулярных веществ является размер пор и заряд базальной мембраны клубочка.

Почки играют существенную роль в системе поддержания кислотно-щелочного равновесия плазмы крови. Почки также обеспечивают постоянство концентрации осмотически активных веществ в крови при различном водном режиме для поддержания водно-солевого равновесия. Через почки из организма выводятся конечные продукты азотистого обмена, чужеродные и токсические соединения (включая многие лекарства), избыток органических и неорганических веществ, они участвуют в обмене углеводов и белков, в образовании биологически



активных веществ (в частности — ренина, играющего ключевую роль в регуляции системного артериального давления и скорость секреции альдостерона надпочечниками, эритропоэтина — регулирующего скорость образования эритроцитов).

Почечный клиренс (почечное очищение). Это наиболее используемый показатель, по которому определяют скорость почечной экскреции отдельных веществ из крови. Он определяется как объем плазмы крови, который в единицу времени может быть очищен от конкретного вещества. Клиренс инулина, полифруктазана с  $M \approx 6$  кДа, который хорошо отфильтровывается, но не подвергается активной реабсорбции и секреции, служит показателем скорости клубочковой фильтрации. Нормальное значение скорости клубочковой фильтрации, определенное по инулину, составляет 120 мл/мин.

### **1.2.1 Особенности метаболизма почечной ткани**

Почки относятся к наиболее хорошо снабжаемым кровью органам организма человека. Они потребляют 8% всего кислорода крови, хотя их масса едва достигает 0,8% массы тела. Кортикальный слой характеризуется аэробным типом метаболизма, мозговое вещество — анаэробным. Почки обладают широким спектром ферментов, присущих всем активно функционирующим тканям. Вместе с тем, они отличаются своими «органоспецифическими» ферментами, определение содержания которых в крови при заболевании почек имеет диагностическое значение. К таким ферментам прежде всего относится глицин-амидо-трансфераза (она активна также в поджелудочной железе), осуществляющая перенос амидиновой группы с аргинина на глицин. Эта реакция является начальным этапом синтеза креатина: L-аргинин + глицин → L-орнитин + гликоциамин. Из изоферментного спектра для коркового слоя почек характерными являются ЛДГ1 и ЛДГ2, а для мозгового вещества — ЛДГ5 и ЛДГ4. При острых почечных заболеваниях в крови определяются повышенная активность аэробных изоферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ1 и ЛДГ2) и изофермента аланинаминопептидазы — ААП3.

Наряду с печенью почки являются органом, способным осуществлять глюконеогенез. Этот процесс протекает в клетках проксимальных канальцев. Основным субстратом для глюконеогенеза служит глутамин, который одновременно выполняет буферную функцию по поддержанию необходимой pH. Активация ключевого фермента глюконеогенеза — фосфоенолпируваткарбоксикиназы — вызывается

появлением в притекающей крови кислых эквивалентов. Следовательно, состояние ацидоза приводит, с одной стороны, к стимуляции глюконеогенеза, с другой, – к увеличению образования  $\text{NH}_3$ , т.е. нейтрализации кислых продуктов. Однако избыточная продукция аммиака – гипераммониемия – уже будет обуславливать развитие метаболического алкалоза. Повышение концентрации аммиака в крови является важнейшим симптомом нарушения процессов синтеза мочевины в печени.

Реабсорбция и секреция различных соединений в почках регулируется ЦНС и гормонами. Так, при эмоциональном и болевом стрессах может развиваться анурия (прекращение мочеотделения). Всасывание воды увеличивается под действием вазопрессина. Его недостаток ведёт к водному диурезу. Альдостерон увеличивает реабсорбцию натрия, а вместе с последним – и воды. Паратирин влияет на всасывание кальция и фосфатов. Этот гормон увеличивает экскрецию фосфатов, в то время как витамин Д задерживает её.

Постоянство рН крови поддерживается её буферными системами, лёгкими и почками. Постоянство рН внеклеточной жидкости (и косвенным путём – внутриклеточной) обеспечивают лёгкие путём удаления  $\text{CO}_2$ , почки – посредством выведения аммиака и протонов и реабсорбцией бикарбонатов.



Рисунок 1.2.1.1 Механизм реабсорбции и секреции ионов в клетке канальца почки

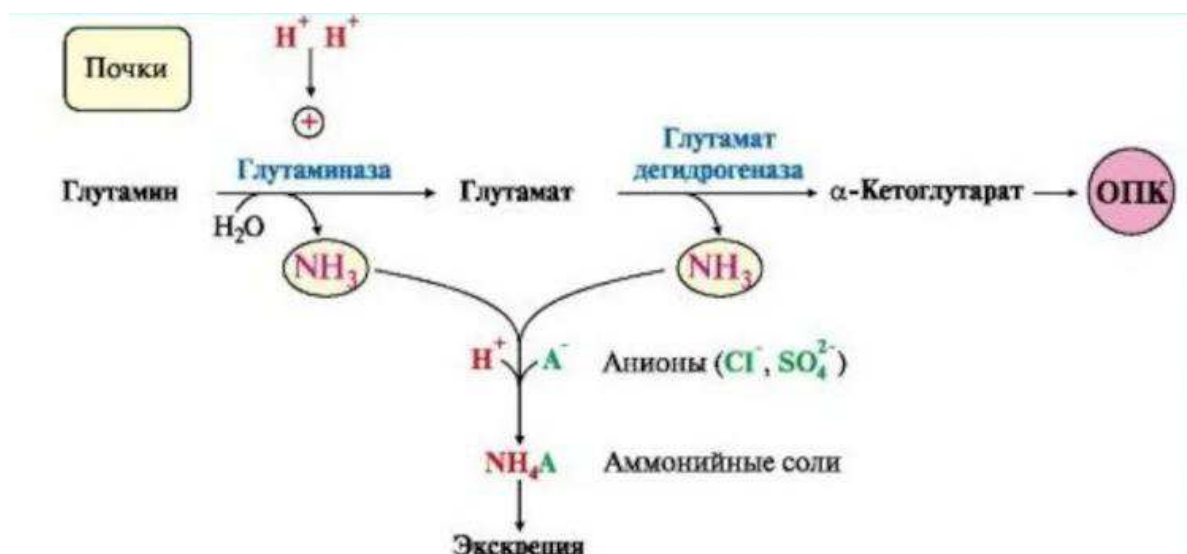
Основными механизмами в регуляции кислотно-основного равновесия являются процесс реабсорбции натрия и секреция ионов водорода, образуемых с участием карбангидразы. Карбангидраза (кофактор Zn) ускоряет восстановление равновесия при образовании угольной кислоты из воды и углекислоты:



При кислых значениях pH повышается  $p\text{CO}_2$  и вместе с этим – концентрация  $\text{CO}_2$  в плазме крови.  $\text{CO}_2$  уже в большем количестве диффундирует из крови в клетки почечных канальцев. В почечных канальцах под действием карбангидразы образуется углекислота, диссоциирующая на протон и ион бикарбоната.  $\text{H}^+$ -ионы с помощью АТФ-зависимого протонного насоса или путём замены на  $\text{Na}^+$  транспортируются в просвет канальца. Здесь они связываются с  $\text{HPO}_4^{2-}$  с образованием  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ . С противоположной стороны канальца (граничащей с капилляром) с помощью карбангидразной реакции образуется бикарбонат, который совместно с катионом натрия (котранспорт  $\text{Na}^+$ ) поступает в плазму крови.

Важнейшим механизмом, способствующим сохранению натрия в организме, является образование в почках аммиака.  $\text{NH}_3$  используется вместо других катионов для нейтрализации кислых эквивалентов мочи. Источником аммиака в почках служат процессы дезаминирования глутамина и окислительного дезаминирования аминокислот, в первую очередь, глутаминовой.

Глутамин – амид глутаминовой кислоты, образующийся при присоединении к ней  $\text{NH}_3$  ферментом глутаминсинтазой, или синтезированный в реакциях трансаминирования.



### Рисунок 1.2.1.2 Образование аммиака в почках

В почках амидная группа глутамина отщепляется гидролитическим путём от глутамина ферментом глутаминазой I. При этом образуется свободный аммиак (рис. 2).

Аммиак может легко диффундировать в почечные канальцы и там легко присоединять протоны с образованием иона аммония:  $\text{NH}_3 + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{NH}_4^+$

Основными органами мочевыделительной системы, как у половозрелых, так и неполовозрелых мышей, являются почки. И у тех, и у других, они расположены по обе стороны позвоночника забрюшинно и имеют бобовидную форму.

Из ворот почек выходят мочеточники, которые впадают в мочевой пузырь. Мочеиспускательный канал у мышей-самцов расположен прямолинейно. У самок он оканчивается на нижней стенке влагалища, отверстие его прикрыто специальной складкой. Вес почек мыши составляет 0,6-0,7% веса тела. Правая почка мыши весит 0,14 г, а левая - 0,13 г. Ферменты более активны у неполовозрелых мышей, чем у половозрелых мышей.

### 1.2.2 Влияние соединений фтора на проницаемость клеточных мембран

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 мембраны 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, остеобласты, 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 фосфорнокальцевый обмен, в частности ингибируется активность  $1\alpha$

гидроксилазы в проксимальных канальцах, в результате чего снижается продукция и содержание в сыворотке крови  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  кальцитриола [2, 3]. Соединения фтора в эритроцитах, мозге, почках ингибируют  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  АТФазу, либо выступают в роли котранспортёров, 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.

### 1.2.3 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. 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 огромное 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. 8) осуществляет обратимое окисление глицеро-3-фосфата в диоксиацетонфосфат. Фермент занимает центральное положение в реакциях липидного обмена и участвует в работе -глицерофосфатного водородного шунта, с помощью которого электроны НАДН, синтезированного в цитоплазме, способны включаться в митохондриальную дыхательную цепь [15].

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ, КФ 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].

НАД - зависимая малатдегидрогеназа (МДГ, КФ 1. 37) – фермент, который катализирует обратимое окисление малата в оксалоацетат. Данная оксидоредуктаза локализуется в митохондриях (ЦТК) и в цитоплазме. В митохондриях уровень соотношения НАДН/НАД относительно велик, в результате чего внутримитохондриальный оксалоацетат восстанавливается в малат, который легко выходит из митохондрий. В цитоплазме уровень отношения НАДН/НАД мал, что приводит к окислению малата при участии цитоплазматической НАД - зависимой МДГ. МДГ принимает участие в реакциях азотного обмена. Одним из ключевых интермедиатов азотного обмена является аспартат, который синтезируется в результате трех сопряженных реакций. Кроме того, МДГ принимает участие в работе малат-аспартатного водородного шунта митохондрий [49]. Малик-фермент (НАДФ-МДГ) является наиболее существенным в системе липидного анаболизма, и через восстановление НАДФ принимает участие в реакциях катаболизма ксенобиотиков и осуществляет шунтирование медленных реакций ЦТК [16]. В клетках существует два типа изоцитратдегидрогеназ. НАД-зависимая изоцитратдегидрогеназа (НАДИЦДГ, КФ 1. 41) находится только в митохондриях, а НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа (НАДФИЦДГ, КФ 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. 2) или НАДФ (КФ 1. Реакция включает анаэробную фазу дегидрирования глутаминовой кислоты с образованием промежуточного продукта – иминоглутаровой кислоты, после чего осуществляется спонтанный гидролиз с образованием аммиака и -кетоглутаровой кислоты. Данные реакции являются обратимыми [15].

#### **1.2.4 Возрастные морфологические особенности почек лабораторных мышей**

По мере старения происходит медленное, но неизменное уменьшение массы почек. По мере старения происходит сужение артерий, поставляющих кровь почкам. Поскольку по суженным артериям поступает недостаточный объем крови для почек нормального размера, то размер почек может уменьшаться. Кроме того, утолщаются стенки мелких артерий, по которым кровь попадает в клубочки, что снижает функцию оставшихся клубочков. Вместе с этими потерями происходит снижение способности нефронов выводить продукты жизнедеятельности и многие лекарственные препараты, а также снижается способность концентрировать или разбавлять мочу и выводить кислоту.

Тем не менее, несмотря на возрастные изменения, функция почек сохраняется на достаточном уровне для удовлетворения потребностей организма. Изменения, которые происходят с возрастом, сами по себе не являются заболеванием, но эти изменения уменьшают резерв почек. Другими словами, обеим почкам может потребоваться функционировать почти на полную мощность, чтобы обеспечить все обычные функции почек.

Таким образом, даже незначительное поражение одной или обеих почек может привести к утрате их функции.

## **2 Материалы и методы**

### **2.1 Объект исследования**

Объект исследования – почки лабораторных мышей из вивария Сибирского Федерального Университета института фундаментальной биологии и биотехнологии.

В научно-исследовательской работе было использовано 40 самцов лабораторных мышей: 2 опытных группы – 10 неполовозрелых мышей (1 месяц) и 7 половозрелых мышей (7 месяцев); 2 контрольных группы - 6 неполовозрелых мышей (1 месяц) и 7 половозрелых мышей (7 месяцев). Опытные группы 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 ионоселективного электрода**

Содержание фторид-иона определяли в почках лабораторных мышей.

Перед началом проведения измерений образцы подготавливали. На электронных весах отвешивали 0,2 г органа, затем

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.



Метод основан на 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.

Фторид- 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 ионоселективного 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 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 Биolumинесцентное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в гомогенате почки**

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 биolumинесцентного анализа.

Биolumинесцентное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ проводится по ранее разработанным методикам [22]. 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

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. 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 NH<sub>4</sub>Cl в концентрации 5,0 мМ, а для определения ГР – ЭДТА в концентрации 0,5 мМ.

После инкубации исследуемых проб при 37°С 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 реактивы биолюминесцентной системы разведены в 0,1 М К<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>-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 leiognathid* и оксидоредуктазы из *Vibrio fishery* в Институте биофизики СО РАН г. Красноярск. Необходимо учесть, что в разрушенных клетках

присутствует некоторое количество субстрата для работы исследуемых ферментов. Поэтому мы определяли показатели, названные «субстратный фон ферментов» [22].

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).

Таблица 2.3.1 - Концентрация субстратов, кофакторов и показатели pH среды для определения активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в гомогенате 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 рН 9,0 и 9,8 подготовили на Трис-НСl буфере; с рН 7,0, 7,4 и 7,8 – на  $K^+$ ,  $Na^+$ -фосфатном буфере.

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 [22].

Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ рассчитывали по формуле:  $A = \frac{\Delta[C] \cdot V}{T}$ , 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 E=1 мкмоль/мин [22].

Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ из гомогената почек в пересчете на белок рассчитывали по формуле:

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

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

A – активность фермента;

$C_{\text{бел.}}$  – количество белка в пробе [22].



## 2.4 Определение содержания белка

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

Таблица 2.4.1 - Схема внесения реактивов в пробирки для определения общего белка в гомогенате 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. В пробирки необходимо внести реактивы по схеме указанной в таблице 2.

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 рассчитывали по формуле:

,

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

$E_o$  – оптическая плотность опытной пробы, ед.опт.плотн.;

$E_k$  – оптическая плотность калибровочной пробы, ед.опт.плотн.;

$b_0$  – концентрация общего белка в калибровочном растворе, г/л [36, 37].

## **2.5 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- ( $C_{25}$ ) и 75-перцентилей ( $C_{75}$ ). 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 ионов фтора в почках лабораторных мышей

В результате настоящего исследования обнаружено статистически достоверное увеличение концентрации фторидов в гомогенате почек опытных групп лабораторных мышей. В результате воздействия фторида натрия в половозрелой и неполовозрелой группах концентрация ионов фтора достоверно выше более чем в 50 раз по сравнению с контрольными значениями. В таблице 3.1.1 представлены численные результаты исследования.

Таблица 3.1.1 Концентрация ионов фтора (мг/кг) в гомогенате почек лабораторных мышей (Ме ( $C_{25}$ ;  $C_{75}$ ))

Группа мышей	Концентрация фторида, мг/кг, Ме ( $C_{25}$ ; $C_{75}$ )		
	Контроль n=6/n=5	Опыт n=9/n=5	P
Неполовозрелые (1 месяц)	0,015 (0,002; 0,019)	0,882 (0,314; 1,449)	0,004
Половозрелые (7 месяцев)	0,005 (0,003; 0,008)	0,329 (0,085; 0,573)	0,011

При этом с точки зрения возрастных изменений отдельно среди мышей из группы контроля большая концентрация фторидов в гомогенате почек выявляется среди юных мышей. Похожая зависимость наблюдается и в опытной группе. Возможно, это связано с тем, что молодые животные находятся в интенсивной фазе роста, способствуя накоплению фторидов в их органах в большей степени.

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

После воздействия фторида натрия на группу самцов неполовозрелых мышей были обнаружены достоверные повышения уровней следующих оксидоредуктаз: NADPMDH, NADPGDH, NADIDH, GR и R\_NADPGDH (табл. 3.2.1).

Таблица 3.2.1 Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ (мкЕ/1 мг белка) в гомогенате почек контрольной и опытной групп неполовозрелых мышей (Ме ( $C_{25}$ ;  $C_{75}$ ))

фермент	Юные контроль N=6	Юные эксперимент N=9	P
G6PDH	6,255 (0,680;10,351)	5,909 (0,314;30,931)	0,08
G3PDH	2,396 (1,076;6,345)	3,481 (0,314;10,864)	0,4
LDH	28,452 (5,943;75,268)	20,012(0,314;125,138)	0,5
<b>NADPMDH</b>	<b>3,746 (0,023;8,748)</b>	<b>10,928 (0,314;46,003)</b>	<b>0,005</b>
<b>NADPGDH</b>	<b>1,994 (0,573;4,190)</b>	<b>3,351 (0,000;10,789)</b>	<b>0,008</b>
NADPIDH	3,374 (1,337;6,778)	7,824 (0,314;24,901)	0,3
MDH	21,056 (8,137;51,266)	30,163(0,314;194,092)	0,1
NADGDH	17,133 (1,213;38,807)	14,404 (0,000;61,660)	0,16
<b>NADIDH</b>	<b>3,504 (0,085;11,095)</b>	<b>13,402 (0,314;65,002)</b>	<b>0,05</b>
R_LDH	12,955 (0,000;49,230)	5,003 (0,000;29,911)	0,2
R_MDH	14,416 (0,000;53,751)	1,680 (0,000;7,184)	0,5
<b>GR</b>	<b>0,014 (0,000;0,073)</b>	<b>1,827 (0,020;7,184)</b>	<b>0,005</b>
R_NADGDH	3,567 (1,189;8,933)	6,520 (0,314;24,733)	0,9
<b>R_NADPGDH</b>	<b>0,160 (0,042;0,327)</b>	<b>2,943 (0,073;8,124)</b>	<b>0,02</b>

Ферменты: NADPMDH, NADPGDH, NADIDH относятся к определяющим интенсивность биоэнергетических процессов. Тогда как увеличение уровня GR у молодых мышей будет способствовать более эффективной нейтрализации перекисей. Кроме того, накапливающийся НАДФН может использоваться в синтезе жирных кислот, холестерина, а это достаточно важно для сохранения интактного фосфолипидного компонента мембран.

Активность R\_NADPGDH также повышается у неполовозрелых мышей в гомогенате почек после воздействия фторида натрия. Данный фермент является митохондриальным и катализирует восстановительное

аминирование 2-оксоглутарата. По всей видимости наблюдаемая картина изменения метаболических показателей позволяет предположить способность клеток почечной ткани в данном случае запускать механизмы защиты для детоксикации и элиминации фторидов.

В ходе эксперимента в гомогенате почек из группы половозрелых мышей достоверно снижались уровни LDH и MDH, а активность NADGDH достоверно повышалась (табл. 3.2.2).

Таблица 3.2.2 Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ (мкЕ/1 мг белка) в гомогенате почек контрольной и опытной групп неполовозрелых мышей (Me (C<sub>25</sub>; C<sub>75</sub>))

фермент	Взрослые контроль N=5	Взрослые эксперимент N=5	P
G6PDH	7,936 (0,284;24,529)	5,909 (0,551;48,113)	0,7
G3PDH	2,012 (0,447;5,034)	3,762 (0,705;14,050)	0,3
<b>LDH</b>	<b>4,025(13,575;136,464)</b>	<b>3,120 (1,634;126,827)</b>	<b>0,008</b>
NADPMDH	5,411 (0,826;21,790)	7,624 (1,145;36,578)	0,1
NADPGDH	1,937 (0,000;7,524)	1,817 (0,036;8,145)	0,08
NADPIDH	4,539 (1,801;8,744)	4,513 (1,145;9,855)	0,5
<b>MDH</b>	<b>2,422 (3,245;72,275)</b>	<b>2,109 (1,145;176,441)</b>	<b>0,05</b>
<b>NADGDH</b>	<b>2,316 (0,000;85,266)</b>	<b>4,225 (1,145;142,303)</b>	<b>0,02</b>
NADIDH	10,102 (0,024;50,676)	6,924 (0,895;33,799)	0,09
R_LDH	0,318 (0,000;2,227)	6,811 (0,000;40,542)	0,1
R_MDH	0,351 (0,000;2,455)	0,397 (0,000;1,634)	0,5
GR	0,032 (0,000;0,096)	0,409 (0,000;1,634)	0,4
R_NADGDH	2,181 (0,000;8,043)	2,885 (0,578;6,395)	0,19
R_NADPGDH	0,798 (0,205;1,721)	0,571 (0,014;1,634)	0,14

Низкий уровень прямой реакции лактатдегидрогеназы свидетельствует о менее активном окислении цитозольного НАДН, что может привести к торможению процессов гликолиза на уровне гексокиназы и фосфофруктокиназы, а также о менее выраженной способности метаболизировать эндогенный лактат при аэробном дыхании. Активность MDH в гомогенате почек незначительно ниже в экспериментальной группе самцов. При этом реакция, катализируемая NADGDH протекает существенно быстрее. NADGDH –

митохондриальный фермент, участвующий в образовании из глутамата 2-оксоглутарата, который поступает в цикл трикарбоновых кислот.

Таким образом, по-видимому, компенсаторные метаболические возможности почечной ткани выше у юных организмов по сравнению со взрослыми особями.

В рамках изучения возрастных особенностей показателей метаболизма почечной ткани лабораторных мышей, были получены следующие результаты.

При нормальном физиологическом развитии с возрастом у мышей происходит снижение активности R\_LDH и повышение активности R\_NADPGDH (табл. 3.2.3).

Таблица 3.2.3 Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ (мкЕ/1 мг белка) в гомогенате почек контрольной группы неполовозрелых и половозрелых мышей (Me (C25; C75))

фермент	Юные контроль N=6	Взрослые контроль N=5	P
G6PDH	6,255 (0,680;10,351)	7,936 (0,284;24,529)	0,08
G3PDH	2,396 (1,076;6,345)	2,012 (0,447;5,034)	0,4
LDH	28,452 (5,943;75,268)	4,025(13,575;136,464)	0,18
NADPMDH	3,746 (0,023;8,748)	5,411 (0,826;21,790)	0,1
NADPGDH	1,994 (0,573;4,190)	1,937 (0,000;7,524)	0,08
NADPIDH	3,374 (1,337;6,778)	4,539 (1,801;8,744)	0,5
MDH	21,056 (8,137;51,266)	2,422 (3,245;72,275)	0,15
NADGDH	17,133 (1,213;38,807)	2,316 (0,000;85,266)	0,5
NADIDH	3,504 (0,085;11,095)	10,102 (0,024;50,676)	0,13
<b>R_LDH</b>	<b>12,955 (0,000;49,230)</b>	<b>0,318 (0,000;2,227)</b>	<b>0,05</b>
R_MDH	14,416(0,000;53,751)	0,351 (0,000;2,455)	0,15
GR	0,014 (0,000;0,073)	0,032 (0,000;0,096)	0,1
R_NADGDH	3,567 (1,189;8,933)	2,181 (0,000;8,043)	0,5
<b>R_NADPGDH</b>	<b>0,160(0,042;0,327)</b>	<b>0,798 (0,205;1,721)</b>	<b>0,01</b>

Тогда как в экспериментальной группе обнаружено достоверное значительное снижение активности GR и R\_NADPGDH (табл. 3.2.4). То есть в условиях фтористой интоксикации с возрастом возникают значительные затруднения с детоксикацией перекисей и нарушается

нормальное течение внутримитохондриальных процессов, образуется меньшее количество НАДФН.

Таблица 3.2.3 Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ (мкЕ/1 мг белка) в гомогенате почек опытной группы неполовозрелых и половозрелых мышей (Ме (С25; С75))

фермент	Юные эксперимент N=9	Взрослые эксперимент N=5	P
G6PDH	5,909 (0,314;30,931)	5,909 (0,551;48,113)	0,15
G3PDH	3,481 (0,314;10,864)	3,762 (0,705;14,050)	0,07
LDH	20,012(0,314;125,138)	3,120 (1,634;126,827)	0,09
NADPMDH	10,928 (0,314;46,003)	7,624 (1,145;36,578)	0,1
NADPGDH	3,351 (0,000;10,789)	1,817 (0,036;8,145)	0,5
NADPIDH	7,824 (0,314;24,901)	4,513 (1,145;9,855)	0,4
MDH	30,163(0,314;194,092)	2,109 (1,145;176,441)	0,19
NADGDH	14,404 (0,000;61,660)	4,225 (1,145;142,303)	0,14
NADIDH	13,402 (0,314;65,002)	6,924 (0,895;33,799)	0,15
R_LDH	5,003 (0,000;29,911)	6,811 (0,000;40,542)	0,1
R_MDH	1,680 (0,000;7,184)	0,397 (0,000;1,634)	0,5
<b>GR</b>	<b>1,827 (0,020;7,184)</b>	<b>0,409 (0,000;1,634)</b>	<b>0,04</b>
R_NADGDH	6,520 (0,314;24,733)	2,885 (0,578;6,395)	0,08
<b>R_NADPGDH</b>	<b>2,943 (0,073;8,124)</b>	<b>0,571 (0,014;1,634)</b>	<b>0,05</b>

Таким образом, было показано, что состояние метаболического статуса почечной ткани меняется после воздействия фторида натрия *in vivo*, а также зависит от возраста исследуемых объектов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В результате настоящего эксперимента в группах опытных юных и половозрелых мышей обнаружено достоверное значительное увеличение концентрации ионов фтора в гомогенате почек.
2. Показано, что в гомогенате почек, подвергшихся фтористой интоксикации в неполовозрелой группе мышей, достоверно повышается активность NADPMDH, NADPGDH, NADIDH, GR и R\_NADPGDH.
3. В гомогенате почек после воздействия фторида натрия в группе половозрелых мышей обнаружено достоверное снижение активности LDH, MDH и повышение уровня NADGDH.
4. При нормальном физиологическом развитии с возрастом у мышей выявлено достоверное снижение активности R\_LDH и повышение активности R\_NADPGDH. Тогда как в экспериментальной группе обнаружено достоверное значительное снижение активности GR и R\_NADPGDH.

### Список сокращений

АТФ - аденозин-5'-трифосфат

АДФ- аденозин-5'-дифосфат

ГЗФДГ - глицерол-3-фосфатдегидрогеназа

Г6ФДГ - глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа

ГДГ - глутаматдегидрогеназа

ГР - глутатионредуктаза

ЛДГ - лактатдегидрогеназа

Обр. ЛДГ - обратная реакция лактатдегидрогеназы (анаэробная)

Обр. МДГ - обратная реакция малатдегидрогеназы

Обр. НАДГДГ - обратная реакция НАД-зависимой глутаматдегидрогеназы

ПДК – предельно допустимая концентрация

МДГ- малатдегидрогеназа

НАД+ - никотиамидадениндинуклеотид окисленный

НАДН -никотинамидадениндинуклеотид восстановленный

НАДФ+- никотинамидадениндинуклеотидфосфат окисленный

НАДГДГ-НАД-зависимая глутаматдегидрогеназа

НАДИЦДГ - НАД-зависимая изоцентратдегидрогеназа

НАДФИЦДГ - НАДФ-зависимая изоцетратдегидрогеназа

НАДФМДГ- НАДФ-декарбоксилирующая малатдегидрогеназа (малик-фермент)

НАДФГДГ - НАДФ-зависимая глутаматдегидрогеназы

НАДН-ГДГ - НАДН-зависимая реакция глутаматдегидрогеназы

НАДН-ЛДГ- НАДН-зависимая реакция лактатдегидрогеназы( анаэробная)

НАДН-МДГ - НАДН-зависимая реакция малатдегидрогеназы

НАДФН-ГДГ - НАДФ-зависимая реакция глутаматдегидрогеназы

НАДФН-никотиамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный

### Список использованных источников

1. Калетина, Н.И. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов /Н.И. Калетина - М.: ГЭОТАР - Медиа, 2009. - С.907-911.
2. 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., Кнап N. // Pharmacological reports.-2014.- №64.- P.902-911.
3. 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. – 2015. – № 1. – С. 23–26.
4. 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.
5. Дроганова, Т. С. Активность кислой фосфатазы в печени живородки речной (*Viviparus viviparus*) 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.
6. Chioca, L.R. Sodium Fluoride does not Alter Sperm Production or Sperm Morphology in Rats / L. R. Chioca, [et al.]// Brazilian Archives of Biology and Technology.- 2015.- V.55.- №2.- P.257-262.
7. 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.
8. Wei, W. Effect of Fluorosis on Liver Cells of VC Deficient and Wild Type Mice / W. Wei [et al.]//Scientific World Journal.- 2014.-V.2014.- 8 p.
9. 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.- 2015.-V.2015.- 7 p.
10. 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.
11. Dirks, B.: The benefits of water fluoridation/ Dirks B.// Caries Res. - 1974.- №8.- P. 2-15.




12. Плэмбек, Дж. Электрохимические методы анализа/ Плэмбек Дж. - М.: Мир, 1985. - 496 с.
13. Wimalawansa, S. J. The role of ions, heavy metals, fluoride, and agrochemicals: critical evaluation of potential aetiological factors of chronic kidney disease of multifactorial origin (CKDmfo/CKDu) and recommendations for its eradication / S. J. Wimalawansa // Environ Geochem Health. - 2016 – № 38. - P. 639–678.
14. Wasana1, H. M. S. The impact of aluminum, fluoride, and aluminum–fluoride complexes in drinking water on chronic kidney disease / H. M. S. Wasana1 [et al.] // Environ Sci Pollut Res. – 2015. - № 22. - P. 11001–11009.
15. Алехина, Д. А. Экспериментальное исследование субхронического воздействия фторида натрия на компоненты редокс-сигнальной системы: автореф. дис. ... канд.биол.наук: 14.03.03 / Алехина Дарья Александровна.- Новосибирск., 2017. – 24 с.
16. Тригуб, В.И. Физиологическая роль фтора: медико-географические аспекты (обзор литературы) / В.И. Тригуб // Вестник ОНУ. Сер: Почвоведения и география почв. -2013. - Т. 18. – № 2(18). – С. 274-283.
17. Жукова, А.Г. Современные представления о молекулярных механизмах физиологического и токсического действия соединений фтора на организм / Жукова А.Г. [и др.] // Медицина в Кузбассе.- 2017.- Т.16.- №3.- С. 2-11.
18. Сапин, М.Р. Анатомия человека / М.Р. Сапин, Г.Л. Билич.- М.: Оникс, 2007.- 512 с.
19. Campbell, A. D. Determination of fluoride in various matrices / A.D. Campbell // Pure & App. Chem.- 1987.- Vol. 59.- №. 5, P. 695-702.
20. Zuo, H. Toxic effects of fluoride on organisms / Zuo H. [et al.] // Life Sciences.- 2018.- Vol. 198.- P. 18-24.
21. Wei, Y. Comparative proteomic analysis of fluoride treated rat bone provides new insights into the molecular mechanisms of fluoride toxicity / Y. Wei // Toxicology Letters.- 2018.- Vol. 291.- P. 39-50.
22. 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.
23. Hongrui, G. Effects of sodium fluoride on blood cellular and humoral immunity in mice /Hongrui Guo [et al.]// Oncotarget.- 2017.- Vol. 8.- № 49.- P. 85504-85515.

24. Sananda D. Fluoride Fact on Human Health and Health Problems: A Review / Sananda D, Biplab G // *Medical & Clinical Reviews*.- 2016.- Vol.2.- № 1.- 6 p.
25. Martinez-Mier, E.A. Fluoride: Its Metabolism, Toxicity, and Role in Dental Health / E. A. Martinez-Mier // *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*.- 2014.- № 3.- P.83-92.
26. Kivraka, Y. Effects of fluoride on anxiety and depression in mice / Kivraka Y. // *Fluoride*.-2012.-V. 45.- I.3. -P. 302-306.
27. Плахтий, Л. Я. Хроническое токсическое действие фторида натрия на функции почек крыс в эксперименте / Плахтий Л.Я [и др.]// *Фундаментальные исследования*.- 2014.- № 11. – С.696-700.
28. *Окружающая среда. Энциклопедический словарь-справочник: Немецко-русский словарь по охране окружающей среды: пер. с нем.* – М.: Прогресс, 1993 . – 640 с
29. Калетина, Н.И. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов /Н.И. Калетина - М.: ГЭОТАР - Медиа, 2009. - С.907-911.
30. Держинский, Ф. Я. Сравнительная анатомия позвоночных животных / Ф.Я. Держинский. - М.: Аспект Пресс, 2005.- С. 153-185.
31. Зайчик А.Ш., Основы патохимии / Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. - СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2001. - 687 с.
32. 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.
33. Dirks, B.: The benefits of water fluoridation/ Dirks B.// *Caries Res*. - 2016.- №8.- P. 2-15.
34. Шалина, Т. И. Общие вопросы токсического действия фтора / Шалина Т.И., Васильева Л.С. // *Сибирский медицинский журнал*. – 2009. – № 5. – С. 5–8.
35. 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*. - 2017. - Vol. 56. - № 6. - P.273-276.

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Е.И.Шишацкая

« 25 » июня 2021г.

## БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Особенности метаболизма почечной ткани *in vivo* при хронической  
интоксикации фторидами

Руководитель

  
\_\_\_\_\_

доцент, к.б.н.

Ю.С. Акопова

Выпускник

  
\_\_\_\_\_

Т.А. Рогачева

Красноярск 2021