

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 2018г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Метаболические изменения в организме лабораторных мышей
разных возрастов под влиянием фторида натрия

06.04.01 Биология
06.04.01.05 Реконструктивная биоинженерия

Научный руководитель	_____	доцент, к.б.н.	Ю.С. Аكوпова
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Выпускник	_____		И.Б. Лескова
	подпись, дата		инициалы, фамилия
Рецензент	_____	доцент, к.б.н.	И.С.Коротченко
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия

Красноярск 2018

АННОТАЦИЯ

В работе изучено накопление фторидов в скелетной ткани лабораторных мышей и влияние фторидов на метаболизм эритроцитов неполовозрелых и половозрелых мышей. Опытные группы мышей в течение месяца поили водой с фторидом натрия в концентрации 50 мг/л. Потенциометрическим методом обнаружено увеличение концентрации ионов фтора в бедренной кости опытных групп, а так же то, что неполовозрелые мыши накапливают фториды в большей степени, чем половозрелые. Билюминесцентным методом показано увеличение активности Г6ФДГ, ГР и снижение ЛДГ у опытных групп мышей всех возрастов, а отдельно у неполовозрелых мышей уровни Г6ФДГ, ГР, ЛДГ выше, чем у неполовозрелых.

Ключевые слова:

ФТОРИД НАТРИЯ, МЫШИ, ЭРИТРОЦИТЫ, ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ, БЕДРЕННАЯ КОСТЬ, НАКОПЛЕНИЕ.

АВТОРЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Метаболические изменения в организме лабораторных мышей разных возрастов под влиянием фторида натрия» содержит 50 страниц, 13 иллюстраций, 46 использованных источника.

ФТОРИД НАТРИЯ, МЫШИ, ЭРИТРОЦИТЫ, ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ, БЕДРЕННАЯ КОСТЬ, НАКОПЛЕНИЕ.

Цель: изучить возрастные особенности накопления фторидов в бедренной кости и оценить состояние метаболизма эритроцитов лабораторной мыши в условиях хронической интоксикации.

Задачи:

1. Провести сравнительный анализ содержания фторидов в бедренной кости лабораторных мышей из контрольной и опытной групп разного возраста.

2. Изучить возрастные изменения в содержании фторидов в бедренной кости мышей в группе контроля, а также в опытной группе.

3. Оценить влияние фторида натрия на уровни активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ эритроцитов крови лабораторных мышей из контрольной и опытной групп разных возрастов.

4. Проанализировать возрастные изменения в уровнях активности оксидоредуктаз эритроцитов крови лабораторных мышей в группах контроля, а также в опытной группе.

Актуальность диссертационной работы

Актуальность исследования связана с малоизученностью взаимосвязи возраста с накоплением и влиянием фторидов на организмы животных, а также с необходимостью обоснованного современного прогноза рисков для здоровья людей, проживающих в регионах с высоким содержанием фторидов в питьевой воде, рядом с алюминиевой промышленностью. При этом

модельный эксперимент позволяет оценить содержание микроэлемента в кости и внутренних органах.

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

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	7
1 Обзор литературы	10
1.1 Физико-химические свойства фтора.....	10
1.2 Значение фтора для человека и животных	11
1.2.1 Влияние различных концентраций фтора на организм человека и животных	13
1.3 Особенности возрастных изменений эритроцитов лабораторных мышей	17
1.4 Особенности развития костной системы.....	19
1.5 Влияние фторидов на возрастные изменения в организме лабораторных мышей.....	28
2 Материалы и методы	30
2.1 Объект исследования	30
2.2 Методы исследования.....	30
2.3 Потенциометрический метод определения ионов фтора с использованием ионселективных электродов	30
2.3.1 Пробоподготовка к определению ионов фтора	30
2.3.2 Прямая потенциометрия	31
2.4 Определение содержания гемоглобина	33
2.5 Биolumинесцентное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в эритроцитах крови.....	34
2.6 Статистические методы исследования	37

3 Результаты и обсуждения.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.1 Анализ содержания фторидов в бедренной кости лабораторных мышей	Ошибка! Закладка не определена.
3.2 Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ эритроцитов крови лабораторных мышей	Ошибка! Закладка не определена.
Заключение	Ошибка! Закладка не определена.
Список сокращений	38
Список использованных источников	39

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Фтор – химический элемент, который содержится в атмосферном воздухе, почвах, поверхностных и грунтовых водах, в растительных и животных организмах. В нормальных условиях встречается во всех органах человеческого тела. Ежедневное поступление фтора в организм человека составляет 0,3-1,8 мг, из них с вдыхаемым воздухом в промышленных районах попадает 0,01-0,04 мг [1]. Источниками фторида являются: пищевые продукты; фторированная вода (обычно 1,0 мг/л), фторидные добавки (фторидные таблетки); средства для чистки зубов с содержанием фтора (содержание в среднем 1000 мг/кг); фторидный гель (содержащий в среднем 5000 мг/кг).

Чрезмерное потребление фтора в течение длительного периода времени может привести к серьезной проблеме со здоровьем – флюорозу, которая характеризуется поражениями зубов и нарушениями скелета (деформации, остеопороз и остеохондроз). Эндемический флюороз, как известно, имеет глобальный масштаб, распространенный на всех континентах и затрагивающий миллионы людей.

В настоящее время актуальной является проблема фторидного загрязнения окружающей среды. В условиях интенсификации антропогенной деятельности фтор и его соединения становятся одними из наиболее распространенных загрязнителей в индустриально развитых странах, что обусловлено распределением в природных средах отходов и выбросов нефтеперерабатывающей, металлургической, химической, горнорудной, деревообрабатывающей промышленности [2].

В Российской Федерации колоссальным источником фтористого загрязнения атмосферного воздуха является алюминиевая промышленность (от 7,4 до 292 кг/т алюминия поступает в воздушную среду) [3]. Российские заводы - мировые лидеры по производству алюминия. Общее количество выпускаемого ими первичного алюминия 3966350 тонн в год. Сегодня Красноярский и Братский алюминиевые заводы, которые построены более 40 лет назад, являются самыми крупными в мире и обеспечивают 57% российского и 7% мирового производства алюминия [4].

Около 60 тыс.т. парогазообразных и твердых примесей выбрасывается в атмосферный воздух алюминиевыми предприятиями, из которых с содержанием фтора – 4 тыс.т., где 50% - доля газообразного фтора [5]. Наиболее вредное действие фторидные выбросы алюминиевой промышленности оказывают на расстоянии 0,5–1,5 км от заводов, твердые частицы - до 5 км, а газообразные соединения – и в 30 км [6]. В сточных водах алюминиевых заводов содержание фтора колеблется от 10 до 190 мг/л [7].

Воздействие фтористых соединений приводит к абсорбции фторида и транспортировка через кровь к тканям и органам, вызывая в них структурные изменения и функциональные нарушения [8, 9, 10, 11, 12]. Поэтому оценка содержанием фтора и его распределение в тканях человека и животных могут иметь практическое значение.

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

Актуальность данного исследования связана с необходимостью понимания дозозависимого эффекта фторидов на организм на различных этапах развития животных. При этом модельный эксперимент позволяет оценить содержание микроэлемента в кости и внутренних органах.

Цель: изучить возрастные особенности накопления фторидов в бедренной кости и оценить состояние метаболизма эритроцитов лабораторной мыши в условиях хронической интоксикации.

Задачи:

1. Провести сравнительный анализ содержания фторидов в бедренной кости лабораторных мышей из контрольной и опытной групп разного возраста.

2. Изучить возрастные изменения в содержании фторидов в бедренной кости мышей в группе контроля, а также в опытной группе.

3. Оценить влияние фторида натрия на уровни активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ эритроцитов крови лабораторных мышей из контрольной и опытной групп разных возрастов.

4. Проанализировать возрастные изменения в уровнях активности оксидоредуктаз эритроцитов крови лабораторных мышей в группах контроля, а также в опытной группе.

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

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 Физико-химические свойства фтора

Фтор – это химически активный неметалл, самый лёгкий галоген, представляющий собой бледно-жёлтый газ с резким запахом, агрессивный и ядовитый. Температура плавления фтора крайне низкая, поэтому элемент хранится в жидком или газообразном состоянии.

Атомы фтора обладают очень высокой электроотрицательностью, т.е. способностью притягивать электроны. Фтор наиболее электроотрицательный из всех известных химических элементов. Это характеризует его как химический самый активный элемент, который образует многочисленные соединения. Некоторые его соединения опасны для здоровья людей и животных. Поэтому в списке вредных веществ фтор относится к I классу опасности в почве и ко II-му классу в воде [13].

Чистый фтор настолько агрессивен, что соприкосновение кожи человека с ним может привести к появлению ожога II степени, вода в атмосфере фтора горит синим пламенем, а платина сгорает как порох. Контакт фтора с водородом даже при температуре -252°C (близкой к абсолютному нулю), происходит мощный взрыв.

В обычных условиях фтор – бледно-желтый газ, при температуре -188°C – жидкость канареечно-желтого цвета, при -228°C фтор замерзает, превращаясь в светло-желтые кристаллы. Если температуру понизить до -252°C , эти кристаллы обесцветятся. Запах у фтора резкий и раздражающий, напоминает одновременно запахи хлора и озона. Одной миллионной доли фтора в воздухе достаточно, чтобы человек почувствовал его присутствие.

1.2 Значение фтора для человека и животных

Фтор - это микроэлемент, необходимый для нормальной жизнедеятельности человека. Нормальное суточное поступление фтора для взрослого человека составляет 4 мг (20–25 % с пищей, остальное с питьевой водой).

Основная биологическая роль фтора и его соединений – костеобразование, зубной эмали, формирование дентина, предупреждение развития старческого остеопороза. Фтор участвует и во многих биохимических реакциях в качестве активатора ферментов (аденилатциклазы) и ингибитора (липазы, эстеразы и лактатдегидрогеназы), метаболизма йода и тиреоидных гормонов, синтеза нуклеиновых кислот, белков и липидов [14].

В организме взрослого человека содержится около 2,5–3 г фтора. Суточная потребность во фторе человека - 1,5–5,0 мг. Считается безопасным прием от 1,5 до 4 мг фторида в день. Влияние ежедневного поступления фтора в организм человека является актуальной проблемой и вызывает сильный интерес у ученых всего мира. Зарубежные авторы большое внимание в научных статьях уделяют вопросам влияния фтора на здоровье молодых организмов как наиболее восприимчивой группы, в частности при изучении появления кариеса и флюороза. Интерес к этой проблеме оправдан, так как в настоящее время более 300 миллионов населения Земли алиментарным путем (при ежедневном употреблении питьевой воды и стоматологической продукции) подвергаются воздействию фтора [15].

Почти 99% всего организменного фтора находится в твердых тканях в составе апатита — основного фосфата кальция, отвечающего формуле $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. В минеральной фазе преобладают мелкие кристаллы, погруженные в органическую матрицу. Фториды превосходят все прочие ионы по способности замещения OH^- из-за схожести их ионных радиусов,

одинаковым заряду и степени гидратации, равной двум. Фтор встраивается в апатит в период формирования первичного кристалла или путем замещения OH^- . В живом организме преобладает замещение гидроксильной группы, в особенности у взрослых особей. В результате образуется фторапатит - смешанная форма апатита, отвечающая формуле $\text{Ca}_5\text{F}(\text{PO}_4)_3$. В чистом фторапатите содержание фтора составляет приблизительно 2 моль/кг — величина, которая почти не встречается в твердых тканях. Содержание фтора в костной ткани и зубной эмали обычно составляет 0,05 моль/кг. Это говорит об отношении 40:1 OH^- к фтору в молекуле апатита. Большое количество минерализованных тканей содержит менее 0,5 моль/кг фтора,

Первое место по содержанию фтора среди твердых тканей занимает цемент зуба, кость, дентин и эмаль. Следовательно в организме млекопитающих фтор совместно с кальцием и фосфором формирует и укрепляет костный скелет, зубную эмаль, кроме того, обеспечивает нормальный рост волос и ногтей, а так же стимулирует процессы кроветворения, укрепляет способствует выводу из организма солей тяжелых металлов и радионуклидов, иммунитет, останавливает развитие остеопороза [16].

Костная ткань выполняет роль регулятора концентрации фтора во внеклеточной жидкости, так как способна быстро связывать его избыток и отдавать во внеклеточную жидкость при дефиците.

Концентрация фтора снижается при уменьшении pH. Фтор, соединяясь с гидроксиапатитом, образует фторапатит, однако на его долю приходится лишь 1/40 часть апатита, но его присутствие придает кислотоустойчивость и прочность костям и зубам. Фториды организуют фиксацию кальция в твердых тканях и их минерализацию, также ингибируют липазы, ЛДГ, эстеразу, фосфоглюкомутазу, енолазу, фосфотазу, активируют аденилилциклазы, стимулируют кроветворение, нарушают брожение углеводов в полости рта и уничтожают кариогенные бактерии [17, 18, 19].

Основное биологическое действие фторид-иона – способность эффективно замещать ион гидроксила. Замещение происходит не только в апатите костной ткани, но и в неминерализованных тканях, а также, по-видимому, в активном центре ферментов.

1.2.1 Влияние различных концентраций фтора на организм человека и животных

1.2.1.1 Дефицит фтора

Фтор проявляет выраженную избирательность к твердым тканям и участвует на начальных этапах их минерализации. Однако никаких нарушений этого процесса у опытных животных, которые содержались на дефицитном по фтору рационе в течение нескольких поколений подряд, не обнаружилось. Добиться не удалось и понижения концентрации фторидов в костях ниже уровня необходимого, согласно теоретическим расчетам, для наступления процесса минерализации. (0,01— 0,1 мкмоль/л). Фтор имеет высокое сродство к белку матрикса эмали и, включаясь в эмаль зубного зачатка, может активировать формирование 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 гипофтороза 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].

1.2.1.2 Избыток фтора

Высокие концентрации фторидов токсичны. Симптомы, которые проявляются при всасывании избыточного фтора, многочисленны: флюороз, нарушения слизистой оболочки желудка, понижение концентрационной способности почек. Первые признаки отравления фторидом: тошнота, рвота, боль в области живота. Если концентрация, которая поступила в организм менее 5 мг/кг массы тела, то противоядием служит кальций – молоко или известковая вода. Если доза выше, необходима госпитализация.

Токсическое воздействие фторидов чаще наблюдается при хроническом воздействии на организм. При избыточном поступлении фторидов в организм развивается хроническая фтористая интоксикация - флюороз. У лиц, которые проживают около завода более 5 лет, но никогда не работали на нем, выявлен высокий уровень содержания фтора в волосах и ногтях, высокая степень флюороза [22].

Флюороз - полисистемное заболевание, при котором наблюдаются патологические изменения во многих органах и системах. Поражаются печень, почки, зубы, нейроэндокринная, сердечнососудистая, костная системы [23].

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

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.

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 высоко содержащей 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].

Также было рассмотрено влияние фторидов на психику мышей, а именно тревожность и депрессию. Было доказано, что дополнительное добавление фтора в питьевую воду вызывает у мышей тревогу и стресс [12].

Одно из первых мест в исследовании влияния фтора и его соединений на организмы животных является исследование почек. Так как большая часть соединений фтора выводятся почками, важно исследовать их функциональную активность в условиях фторидной интоксикации. Так в течение месяца, ежедневное введение крысам раствора фторида натрия в дозе 1,25 мг/кг приводит к созданию модели хронической фторидной интоксикации. Данная нагрузка увеличивает водный и спонтанный диурез [13]. А употребление крысами водопроводной воды с содержанием фтора приводит к морфологическим и морфометрическим изменениям почек, а

именно снижается количество почечных телец, увеличивается площадь почечного тельца и площадь почечного клубочка [30].

Большое значение сейчас отводится исследованиям влияния фтора на окислительные процессы в организме. Так, показано, что фторид натрия снижает активность супероксиддисмутазы, каталазы и глутатион пероксидазы в клетках печени мышей [31, 32].

Кроме того, воздействие больших доз фтора вызывает изменение гомеостаза глюкозы и приводит к резистентности к инсулину [33].

Таким образом, вне зависимости от путей поступления и/или условий воздействия, фтор, попадая в организм человека, оказывает токсическое воздействие на целый комплекс органов и систем, включая кардиореспираторную, нейроэндокринную, костно-мышечную системы. Изучение влияния фтора и его соединений на здоровье населения является важной задачей, позволяющей наметить пути профилактики и коррекции негативного воздействия.

1.2.1.3 Нормы содержания фтора в организме

Фтор и его соединения способны накапливаться в различных объектах окружающей среды и присутствуют в них в разных количествах [34]. Естественная концентрация фтора в поверхностных и подземных источниках питьевой воды варьируется в пределах от 0,05 мг/л до 15 мг/л. Это обусловливается климатогеографическими, гидрогеологическими и другими условиями [35]. Норма потребления фтора, рекомендованная ВОЗ, для взрослого населения составляет 1,0-1,5 мг/л и 0,6-0,8 мг/л - для детского.

Фториды распределяются в организме следующим образом: в костях в количестве 112-310 мг/кг, в эмали зубов - 140- 157 мг/кг, в дентине - 293-340 мг/кг, волосах - 53-72 мг/кг, в моче - 0,5 мг/кг, в паренхиматозных органах (0,2-0,8 мг/кг), крови - 0,01-0,03 мг/кг [16].

После перорального приема фторидов их концентрация в плазме крови кратковременно повышается. В нормальных условиях период полураспада, в зависимости от особенностей организма и от принятой дозы фторидов в плазме крови, составляет 2-9 часов [16].

Всасывание фторидов организмом затруднено при наличии труднорастворимых фторидов (фторида кальция). Содержание фторидов в плазме крови, как правило, составляет 0,7-2,4 мкмоль/л [35].

1.3 Особенности возрастных изменений эритроцитов лабораторных мышей

Эритроциты - это высокоспециализированные клетки, транспортирующие кислород из лёгких в ткани. Средняя продолжительность жизни эритроцитов составляет 120 суток. Разрушение их происходит в клетках ретикуло-эндотелиальной системы. В отличие от большинства клеток организма, у эритроцита отсутствуют клеточное ядро, рибосомы и митохондрии.

Глюкоза – это основной энергетический субстрат эритроцита является. Она поступает из плазмы крови путём облегчённой диффузии. Приблизительно 90% глюкозы, используемой эритроцитом, подвергается гликолизу (анаэробному окислению) с образованием молочной кислоты (лактата). Функции, гликолиза в эритроцитах:

1) образование АТФ путем субстратного фосфорилирования. Используется АТФ в основном на обеспечение работы Na^+, K^+ -АТФазы. Она осуществляет транспорт ионов Na^+ в плазму крови из эритроцитов, предотвращает накопление Na^+ в эритроцитах и способствует сохранению формы клетки (двояковогнутый диск).

2) образование НАДН в реакции дегидрирования глицеральдегид-3-фосфата. Что является кофактором фермента метгемоглобинредуктазы,

участвующей в восстановлении метгемоглобина в гемоглобин по следующей схеме:



Это препятствует накоплению метгемоглобина в эритроцитах.

3) при участии фермента дифосфоглицератмутазы в присутствии 3-фосфоглицерата метаболит гликолиза 1,3-дифосфоглицерат превращается в 2,3-дифосфоглицерат (Рисунок 1).

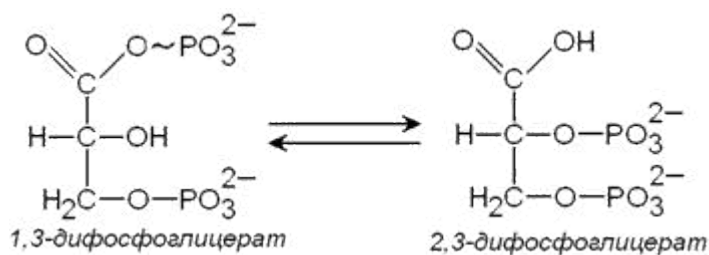


Рисунок 1 – Превращение 3-фосфоглицерата в 2,3-дифосфоглицерат при участии дифосфоглицератмутазы

2,3-Дифосфоглицерат принимает участие в регуляции сродства гемоглобина к кислороду. При гипоксии его содержание в эритроцитах повышается. Дифосфоглицератфосфатаза катализирует гидролиз 2,3-дифосфоглицерата.

Приблизительно 10% глюкозы, потребляющейся эритроцитами, идет в пентозофосфатный путь окисления. Этот путь служит основным источником НАДФН для эритроцита. Этот кофермент необходим для преобразования окисленного глутатиона в восстановленную форму. Ключевой фермент пентозофосфатного пути - глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Его дефицит сопровождается уменьшением отношения НАДФН/НАДФ⁺ в эритроцитах, а так же увеличением содержания окисленной формы глутатиона и снижением резистентности клеток (гемолитическая анемия).

Взаимосвязь возрастной активации свободнорадикальных процессов с действием экстремальных факторов может оказать существенное влияние на эритроциты, онтогенетические изменения которых представлены в литературе крайне фрагментарно [38].

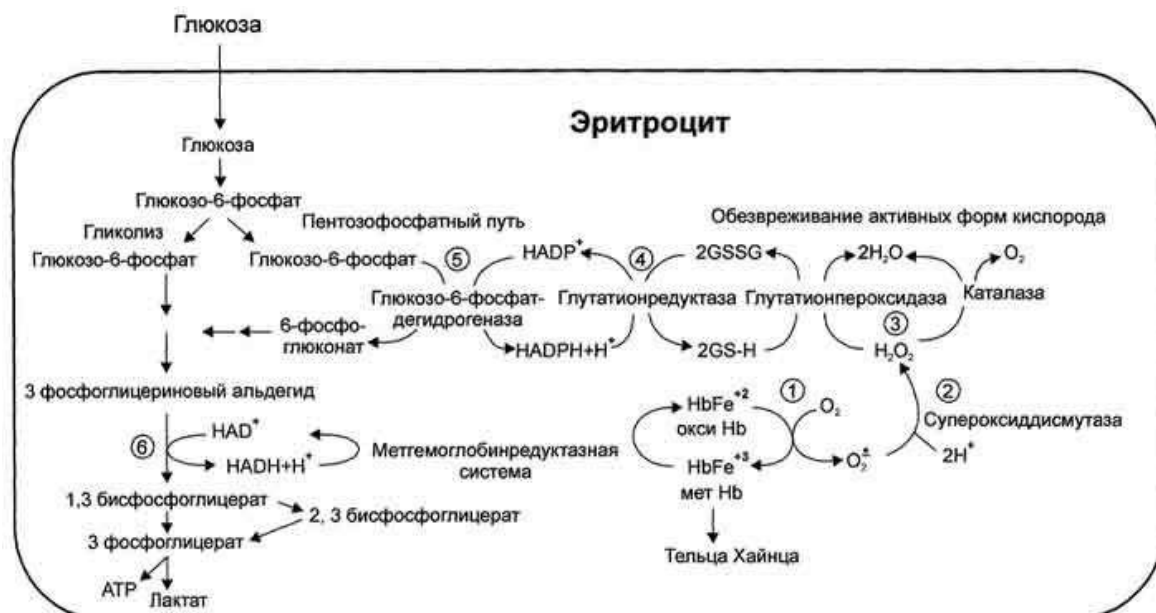


Рисунок 2 – Метаболизм эритроцита

1.4 Особенности развития костной системы

Костная система - одна из интегрирующих систем, так как определяет морфофункциональное состояние всего организма, обеспечивает его благополучие. Объясняется это тем, что она многофункциональна и, кроме присущей ей функции – биомеханической, обеспечивает иммунную защиту организма, поскольку является универсальным органом гемоиммунопоза.

Внутрикостные кровеносные сосуды, которые составляют 50% массы костного органа, обеспечивают необходимое микроокружение для образования и развития клеточных структур эритроидного и лимфоидного ряда. В костных органах есть синусоидные капилляры, их станка построена из высокого эндотелия. Только у них проходят все скрытые процессы

образования и трансформации стволовых полипотентных клеток, обеспечивающих начало иммунокомпетентности структур организма

Рост и развитие костной системы проходит постоянно в течение всей жизни животного и соответствуют действию сил сжатия и растяжения, возникающие в период динамической и статической фаз работы аппарата движения. Деминерализация происходит, когда отсутствует действие биомеханической нагрузки на костный орган. А усиление двигательной активности, напротив, приводит к оптимизации его функций.

Процессы, происходящие в костных органах – это постоянное разрушение и возобновление (резорбции и регенерации) или разрушение старых структур и трансформация в новые, отвечающие условиям действующих биомеханических нагрузок. Однако это обеспечивает не только прочность и легкость костных органов, но и привели к участию костной системы в обмене веществ, гемоиммунотрофики, гомеостазе и частично в крово – лимфообращении и импульсации мозга.

Поэтому биомеханические нагрузки, действующие на костную систему являются необходимым фактором и стимулятором, которые кроме основной, функции движения определяют в ней кроветворную, трофическую и функции обменную веществ и иммунной защиты.

Костный орган – полифункциональный и полиморфологичный. Он включает образование разных по происхождению и физиологическим назначением компонентов: костная ткань (компактная и губчатая), костный мозг (остеобластичный, красный и желтый), гиалиновые хрящи (суставные и метафизарные), надкостница, эндост, кровеносные сосуды и нервы

Скелет млекопитающих преимущественно костный и процент хрящевой ткани в нем сравнительно мал. Однако хрящ и кость - это специализированные производные соединительных тканей и возникают из мезенхимы. Они существенно различаются по природе, способу образования и положению.

Хрящ - полупрозрачный стекловидный материал, гибкий и эластичный. Основное вещество хряща – матрикс – это главным образом сульфатированный полисахарид (хондромукопротеин), образующий плотный гель и содержащий сеть соединительнотканых волокон. В полостях содержатся хондроциты – округлые, лишенные ветвящихся отростков клетки. Они изолированы внутри матрикса. В хряще практически отсутствуют кровеносные сосуды; поэтому питательные вещества для клеток должны достигать их путем диффузии через основное вещество. Наружная хрящевая поверхность покрыта слоем плотной, содержащей клетки соединительной тканью – надхрящницей .

Хрящевой ткани много у зародышей, так как присутствует в зонах костей, которые продолжают рост. У взрослых особей хрящ сохраняется там, где нужна гибкость и податливость материала — это суставные головки, места крепления связок и сухожилий; грудные отделы ребер, ушные раковины и межпозвоночные диски.

Во взрослом состоянии в скелете у мышей преобладает кость.

Основной объем кости состоит из межклеточного вещества – костного матрикса – твердого непрозрачного материала, который пронизан сетью коллагеновых волокон. Между этими волокнами откладывается гидроксиапатит (разновидность фосфата кальция) а так же, в меньшей степени, карбонат и сульфат кальция. Прочность зависит от доли минеральных веществ, которые пропитывают костную ткань. Кости, которые выдерживают максимальную механическую нагрузку являются наиболее прочными. Кости молодых мышей мало минерализованы. Кости. Они отличаются гибкостью и мягкостью.

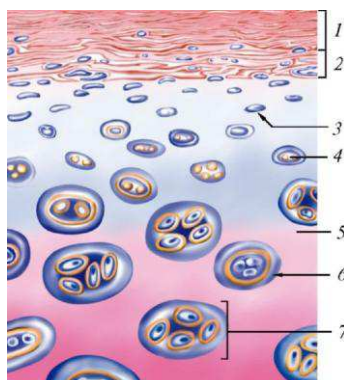


Рисунок 3 - Схема строения гиалинового хряща, покрытого надхрящницей:

1 - волокнистый слой надхрящницы; 2 - клеточный слой надхрящницы; 3 - молодые хондроциты; 4 - хондроцит в лакуне; 5 - межклеточное вещество (хрящевой матрикс); 6 - интерстициальный рост; 7 - изогенные группы хондроцитов (зрелые хрящевые клетки).

В межклеточном веществе находятся костные клетки — остеоциты. Остеоциты и лакуны в кости, в которых они располагаются имеют форму звездчатую и неправильную. Для ранних остеоцитов характерны длинные и ветвящиеся отростки, тянущиеся от лакун во всех направлениях по узким каналцам, которые достигают соседних лакун. Позднее эти отростки могут втягиваться, однако каналцы остаются. Костный матрикс является непроницаемым для питательных веществ и кислорода. Они доставляются к костным клеткам по кровеносным сосудам.

Наружная поверхность кости покрыта надкостницей. Это тонкая и плотная волокниста соединительнотканная оболочка. Когда необходимо глубокая часть надкостницы дает восстановительные клетки поврежденной костной поверхности, которые формируют параллельные костные пластинки. По мере роста кости надкостница связывается с ней пучками шарпеевых волокон, внедряющихся в поверхность кости. По крошечным фолькмановым каналам в надкостнице проходят кровеносные сосуды и нервы. Они ветвятся внутри кости по гаверсовым каналам, которые расположены под разными

углами. Надкостница отсутствует на растущих участках костей, состоящих из хряща и на концах трубчатых костей.

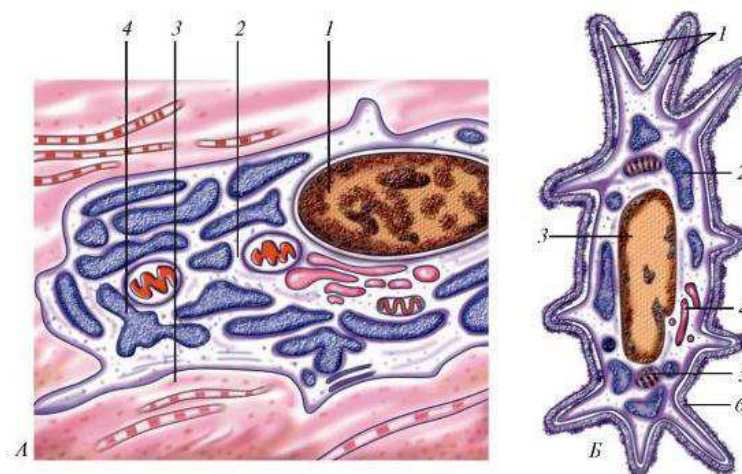


Рисунок 4 - Схема строения костных клеток.

А - строение остеобласта: 1 - ядро; 2 - цитоплазма; 3 - остеид; 4 - развитая зернистая эндоплазматическая сеть; Б - строение остеоцита: 1 - отростки остеоцита; 2 - эндоплазматическая сеть; 3 - ядро; 4 - внутренний сетчатый аппарат; 5 - митохондрия; 6 - остеидное (необызвествлненное) вещество кости по краям лакуны, в которой расположен остеоцит.

Хрящ на срезе выглядит достаточно однородно в отличие от кости. Она имеет сложное внутреннее строение. Большинство участков скелетных элементов, особенно наружные слои, состоят из компактной костной ткани. Обычно она представляет совокупность плотно налегающих друг на друга костных пластинок. У трубчатых костей это выражено наиболее отчетливо у трубчатых костей, которые несут наибольшую нагрузку. Их стенки выстроены остеонами - воложенными одна в другую костных трубочек, которые скреплены плотными пучками коллагеновых фибрилл. Между этими фибриллами располагаются костные клетки, во внутренней полости остеона, в гаверсовом канале, проходит нерв и кровеносный сосуд. Вставочные

костные пластинки заполняют промежутки между остеонами. Благодаря такому строению кость имеет небольшой вес и высокую прочность.

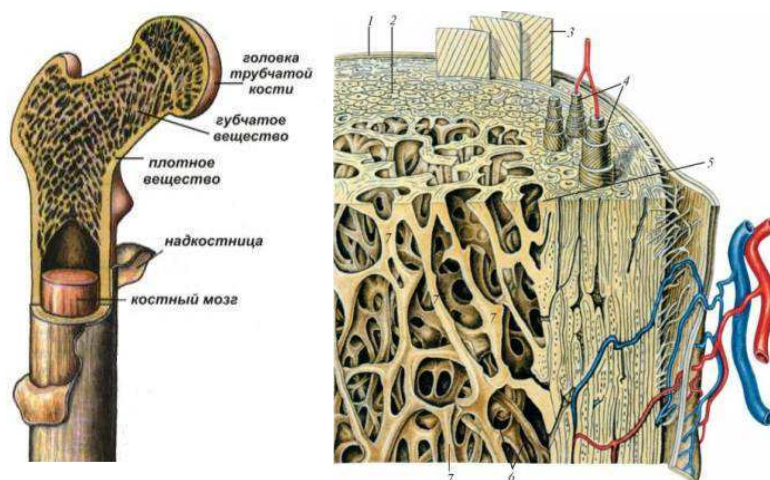


Рисунок 5 - Схема строения трубчатой кости:

1 - надкостница; 2 - компактное вещество кости; 3 - слой наружных окружающих пластинок; 4 - остеоны; 5 - слой внутренних окружающих пластинок; 6 - костномозговая полость; 7 - костные балочки губчатой кости.

Сердцевина коротких и плоских костей, суставные концы трубчатых костей выстроены из губчатой костной ткани. Эта ткань содержит каркас из трабекул - костных балочек. Они ориентированы вдоль линий напряжения в кости. Это обеспечивает оптимальную прочность. После повреждения (перелома кости) с неправильным срастанием вся система костных перемычек в этой области постепенно переориентируется так, чтобы лучше служить при нагрузках. Так, губчатая костная ткань формирует крепкую и легкую и экономичную конструкцию, которая выдерживает значительные нагрузки.

Красный костный мозг - основной объем губчатой кости, который вырабатывает кровяные клетки. В средних частях трубчатых костей, в полостях, содержится желтый костный мозг - депо жира. После больших кровопотерь вместо желтого мозга может создаваться красный костный мозг.

На протяжении всей жизни кости непрерывно перестраиваются путем резорбции старого костного материала и отложения нового. Остеокласты - многоядерные клетки, находящиеся в местах резорбции. Они происходят из моноцитов и принимают участие в рассасывании кости. После разрушения костного материала в этом месте формируются гаверсовы каналы, затем в толще их стенок кость заново формируется концентрическими слоями. Ранее сформированные остатки костных слоев, которые остались не разрушены при образовании новых существующих гаверсовых систем, образуют промежуточную систему. Более того, костная ткань служит основным депо кальция и фосфора (в виде фосфата) - элементов, играющих важнейшую роль в метаболических процессах организма [39].

Вследствие активности мезенхимных клеток возникает костная ткань возникает. Эти клетки становятся остеобластами и далее формируют вокруг себя широкий слой матрикса, который содержит множество волокон. Достаточно быстрое отложение солей кальция в межклеточном матриксе завершает формирование кости. А остеобласты, выполнив свою главную функцию, становятся остеоцитами. Кости мышцей в основном являются замещающими, или эндохондральными. В гораздо меньшей степени представлены покровные и мембранные кости.

Постепенное замещение хрящевой ткани костным органом, характерным для взрослой особи – это формирование эндохондральной кости. Значительная часть костного материала обычно с самого начала откладывается снаружи от зародышевого хряща. На ранних стадиях развития в длинных трубчатых костях конечностей хрящ принимает окончательную форму взрослой кости, имеющей крайне малые размеры. Затем хрящ претерпевает изменения и перерождение в области середины длины: хондроциты набухают, затем выстраиваются в продольные столбики, а материал меж ними обызвествляется, затем хрящевые клетки погибают. Разрушение хряща происходит, когда кровеносные сосуды внедряются в

хрящ с поверхности. Остеобласты, которые проникают с кровеносными сосудами, откладывают кость на месте разрушения хряща. Окостенение происходит от центра к обоим концам элемента.



Рисунок 6 - Срез части метаподия зародыша мыши с процессом окостенения стержня (кость показана черным).

Замещение хряща было бы завершено в короткое время, если бы хрящ не рос, однако получился бы полностью окостеневший элемент маленького размера. Хрящ растет с двух концов с той же скоростью, что и разрушается в центре, поэтому полностью окостеневший элемент не получается. За хрящем постоянно следуют остеобласты, иногда окостенения никогда и не догоняет хрящ с обоих концов элемента. Когда кость полностью окостеневаает, то рост прекращается, потому что внутренние скелетные элементы своими концами сочленяются с соседними. Когда кость полностью окостеневаает, то рост прекращается, потому что внутренние скелетные элементы своими концами сочленяются с соседними. Добавить кость непосредственно на сочленовные поверхности без вреда для суставов нельзя [39].

У млекопитающих и, в частности, у мышей имеются добавочные центры окостенения. Стандартно они развиваются на эпифизах и на выступающих отростках для прикрепления мышц. Тут появляются центры окостенения, на подобие центру диафиза, однако меньшего размера. Эти центры могут превратить эпифизы в кость задолго до того, как рост диафиза

закончился и, таким образом, несмотря на неполное окостенение, позволяют костному элементу полноценно функционировать. Между эпифизом и диафизом долго сохраняется прослойка хряща. Это зона роста; здесь хрящ непрерывно растет и замещается костью со стороны и диафиза, и эпифиза. Таким образом, удлинение кости может совершаться, не затрагивая ее сочленений. Стоит окостенению уничтожить срединную прослойку хряща, как диафиз и эпифиз объединяются — рост кости заканчивается и ею достигается окончательный взрослый размер. В этом отношении млекопитающие представляют контраст подавляющему большинству рептилий, у которых предельной величины взрослого животного нет, и рост, по-видимому, может продолжаться всю жизнь.

Хотя значительная часть прироста внутренней - «хрящевой» - кости происходит путем замещения хряща, этим дело не ограничивается. Когда закладывается центр окостенения стержня длинного элемента, последний имеет маленький диаметр. По мере того как хрящ растет с обоих концов, они постепенно утолщаются, приближаясь к окончательному размеру, так что если бы кость формировалась исключительно путем внутреннего замещения, то она напоминала бы по форме песочные часы с суженной средней частью. Для исправления этого дефекта, помимо внутреннего замещения, в «хрящевых» костях происходит значительное приращение за счет непосредственного формирования на поверхности хряща перихондральной кости, образующей следующие друг за другом концентрические слои. Эти слои толще всего в первоначально тонкой средней части стержня. Процесс поверхностного добавления костного материала может продолжаться и после того, как лежащий глубже стержень окостенел; на этой стадии термин периостальная кость подходит лучше, чем перихондральная.

Кости, которые имеют кожное происхождение, имеют более простой процесс формирования покровных костей. Тогда группа мезенхимных клеток в дерме берет свойства остеобластов и откладывает тонкие, неправильной

формы пленки или пластинки плотного волокнистого межклеточного вещества. Там вскоре откладываются характерные для кости соли минералов. Там вскоре откладываются характерные для кости соли минералов. Такие пластинки постепенно растут с краев и уплотняются путем добавления новых слоев кости на внутренней и наружной поверхностях. У взрослых особей пластинчатые покровные кости состоят из внутреннего и наружного слоев компактной кости с промежуточным слоем губчатой кости, возникшим в результате перестройки. У млекопитающих покровные кости имеются в черепе, нижней челюсти и плечевом поясе. За редкими исключениями вторичного характера (например, челюстной сустав), они совершенно не содержат хрящевой ткани [41].

1.5 Влияние фторидов на возрастные изменения в организме лабораторных мышей

Молодые особи особенно чувствительны к действию фторидов. В во время интенсивного роста до 6 месяцев может замедлиться рост, может произойти задержка полового развития. Потребление воды с концентрацией более 4 мг/л ведет к поражению флюорозом молочных и постоянных зубов, замедлению продольного роста скелета, заболеваниям ревматизмом, энурез и логоневроз, скалиоз, развитию нейроциркуляторной дистонии по гипотоническому типу, гипацидных и аноцидных гастритов, снижение функциональной подвижности нервных процессов. Токсическое действие более выражено в условиях недостатка питания: дефицита белка, кальция, витамина Д. Избыточное поступление фтора в организм молодых особей сопровождается понижением содержания кальция и селена в сыворотке крови и изменениями в твердых тканях зубов, а уровень ионов кальция зависит от дозы фтора.

Вследствие недостаточного количества кальция в воде и значительного превышения содержания натрия, в организме животного (особенно в период роста и развития) формируется кистковоспецифична ЩФ, которая является биохимическим маркером костных заболеваний: остеопороз и остеомиляция. Фтор, медленно выходясь из организма, накапливается в костной и жировой тканях, а также имеет очень длительный период полувыведения. Хроническое воздействие проявляется в нарушениях на уровне клеток и тканей вплоть до некроза. И тогда патологический процесс становится необратимым .

В организме молодых особей фтор задерживается в значительно больших количествах, чем у взрослых. Флюорозом поражаются зубы, проживающих в эндемичных средах с рождения или раннего детства, когда их зубы находились в стадии неполного формирования. Заболевание не возникает у особей, которые попали в центр эндемического флюороза после прорезывания зубов. После завершения минерализации эмали даже значительные концентрации фтора в воде (до 6 мг/дм³) не могут повлечь флюороз зубов. Степень тяжести поражения флюорозом зубов зависит от концентрации фтора в питьевой воде. В средах эндемического флюороза в могут возникать выраженные формы поражения зубов флюорозом путем искусственного вскармливания или раннего прикорма новорожденных. Временные зубы у детенышей также поражаются, как и постоянные.

Доказано, что в ячейках эндемического флюороза среди неполовозрелых особей частота начальных форм флюороза временных зубов может достигнуть 50% [43]. Внешняя среда сильно влияет на организм, в особенности на костную систему, в том числе - на зубы.

2 Материалы и методы

2.1 Объект исследования

Работу проводили на базе 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 40 самцов лабораторных мышей: 2 опытных группы – 10 неполовозрелых мышей (1 месяц) и 10 половозрелых мышей (7 месяцев); 2 контрольных группы - 10 неполовозрелых мышей (1 месяц) и 10 половозрелых мышей (7 месяцев). 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 Методы исследования

2.3 Потенциометрический метод определения ионов фтора с использованием ионселективных электродов

2.3.1 Пробоподготовка к определению ионов фтора

Содержание фторид-иона определяли в бедренной кости лабораторных мышей.

Перед измерениями концентрации ионов фтора исследуемые пробы измельчают ножницами и взвешивают. К измельченным костям добавляют по 0,5 мл концентрированной азотной кислоты и оставляют в термостате на

12 часов при температуре +4 °С, чтобы пробы растворились. Затем образцы сжигают при 1200 °С в течение 20 мин. После охлаждения рН проб доводят до 3 цитратом натрия (1,5 М, рН=5,25). Содержание фторид-иона в пробах определяют с помощью фтор-селективного электрода и выражают в мкг/кг.

2.3.2 Прямая потенциометрия

Наиболее простым и экспрессным способом определения ионов фтора в воде является потенциометрический метод с применением ионселективных 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 Al^{3+} и Fe^{3+} оказывают мешающее действие на определение фторид-ионов, т.к. связывают ионы фтора в комплексное соединение. Поэтому в состав буфера для создания общей ионной силы добавляют цитрат натрия, который вытесняет фторид-ионы из их комплексов с металлами.

Фторидный электрод имеет форму цилиндра и состоит из корпуса, ионселективной мембраны и контактного внутреннего электрода. Активной частью электрода является мембрана, представляющая собой монокристалл фторида лантана с добавкой фторида европия [45].

Для определения концентрации фторид-ионов в измерительный стаканчик помещают 10 мл пробы и 10 мл буферного раствора (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). 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.

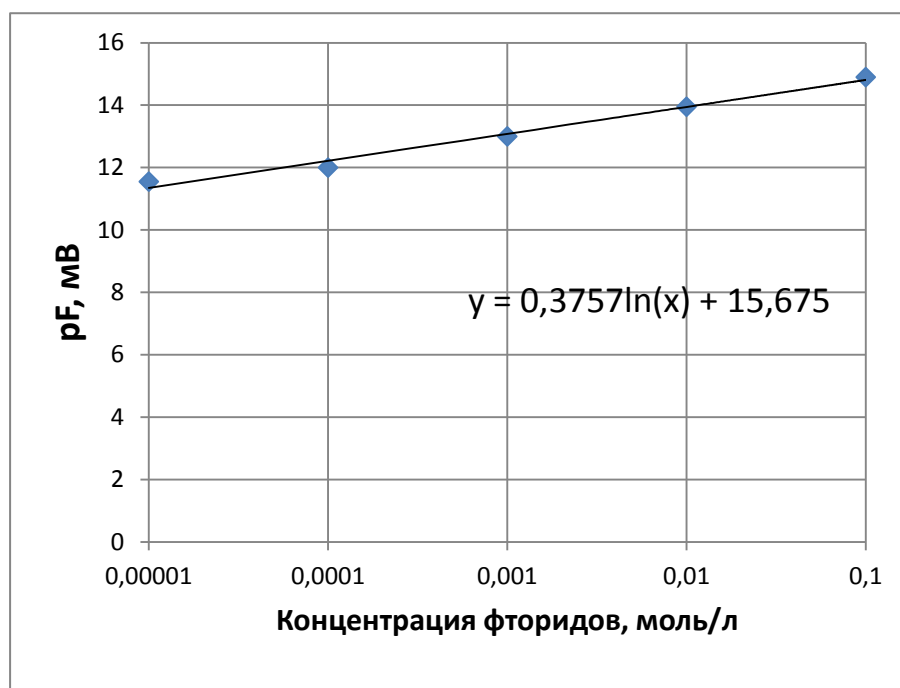


Рисунок 2.1 – Калибровочная кривая по стандартным растворам фторида натрия

Выполнение измерений основано на изменении потенциала ионселективного электрода в зависимости от активности фторид-ионов в растворе. Измерения проводят в присутствии буферного раствора - индифферентного электролита, поддерживающего в анализируемом растворе определенное значение рН и ионной силы, что позволяет градуировать прибор в единицах концентрации, а не активности фторид-ионов. Концентрацию фторидов в пробе находят, исходя из градуировочной

зависимости величины электродного потенциала от значения обратного логарифма активности (концентрации) фторид-ионов (pF). Потенциал ионселективного электрода зависит только от концентрации свободных фторид-ионов. Фториды, присутствующие во взвешенных веществах, либо связанные в прочные комплексы не влияют на величину потенциала электрода [39].

2.4 Определение содержания гемоглобина

Содержание гемоглобина (Hb) определяют унифицированным гемиглобинцианидным методом с использованием набора реактивов фирмы «Агат-Мед».

Принцип метода: Hb крови при взаимодействии с железосинеродистым калием (красная кровяная соль) окисляется в Met-Hb, образующий с ацетонциангидрином гемиглобинцианид (цианметгемоглобин), оптическая плотность которого при 540 нм пропорциональна концентрации Hb в образце крови. Содержание Hb в опытных образцах выражают в граммах на литр упакованных эритроцитов.

Ход работы: К 5 мл трансформирующего раствора добавляют 0,02 мл крови (разведение в 251 раз) или гемолизата (разведением не более, чем в 10 раз), хорошо перемешивают. Определение проводят через 10 минут против холостой пробы (трансформирующего раствора), окраска устойчива в течение не менее 1 часа.

При использовании спектрофотометра определение оптической плотности проводят при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. Содержание гемоглобина рассчитывают по формуле:

$$Hb(g/l) = D_{540} \times 367,7 \quad (1)$$

При использовании фотоколориметра определение проводят в диапазоне длин волн 500-560 нм (зелёный светофильтр). Калибровочный

раствор гемоглобина обрабатывают так же, как и пробу цельной крови.

Расчёт содержания гемоглобина производят по формуле :

$$Hb(\text{г/л}) = \frac{D_o}{D_x} \times 120, \quad (2)$$

где: Hb – содержание гемоглобина в опытной пробе, г/л;

D_o – оптическая плотность опытной пробы;

D_x – оптическая плотность калибровочной пробы;

120 – содержание гемоглобина в калибровочном растворе, г/л.

2.5 Билюминесцентное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в эритроцитах крови

Билюминесцентное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ проводится по ранее разработанным методикам [46]. После однократного замораживания-размораживания эритроциты 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 разрушенных эритроцитов. Конкретные значения концентраций субстратов и кофакторов, а также pH среды для определяемых ферментов представлены в таблице 2.1. Кроме того следует отметить, что в инкубационную смесь определения активности ГР – добавляли ЭДТА в концентрации 0,5 мМ.

После инкубации исследуемых проб при 37°C в течение 30 минут (для ферментативных реакций с восстановлением НАД(Ф)⁺) или 5 минут (для реакций с окислением НАД(Ф)Н) к 200 мкл пробы добавляли 50 мкл флавинмоноклеотида (ФМН) в концентрации $1,5 \cdot 10^{-5}$ 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 K^+, Na^+ -фосфатном буфере с рН 7,0).

Таблица 2.1 - Концентрация субстратов, кофакторов и показатели рН среды для определения активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в эритроцитах биолюминесцентным методом

Фермент	Субстрат – мМ	Кофактор – мМ	рН 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
НАДНЛДГ	Пируват – 0,25	НАДН – 0,005	7,0
ГР	GSH – 0,5	НАДФН – 0,0025	7,4

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.

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: ФМНоксидоредуктаза-люцифераза изготовлена из очищенных методами ионообменной хроматографии и гель-фильтрации люциферазы из *Photobacterium leiognathi* и оксидоредуктазы из *Vibrio fischeri* 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».

Определяли при таких же условиях, что и для вышеперечисленных дегидрогеназ, однако в инкубационную пробу вместо соответствующего субстрата добавляли буфер. В результате измерения свечения на билюминометре получаем относительные значения активности исследуемых ферментов. Для получения абсолютных значений активности нужно построить график зависимости интенсивности билюминесценции 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 билюминометра, содержащие билюминесцентные реактивы в концентрациях указанных выше, после чего производилось измерение интенсивности билюминесценции. В связи с широким диапазоном рН буферов, используемых для определения дегидрогеназной активности, а также рН-зависимостью билюминесценции ферментативной системы, калибровочные графики строились для каждого рН буфера.

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

$$A = \frac{\Delta[C] \times V}{T}, \quad (3)$$

где: А-активность фермента;

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

V – объем пробы в миллилитрах;

T – время инкубации.

Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ выражали в ферментативных единицах на 10^4 клеток, где 1 Е=1 мкмоль/мин [39]. В связи с широким диапазоном рН буферов, используемых для определения дегидрогеназной активности, а также рН-зависимостью билюминесценции ферментативной системы, калибровочные графики строились для каждого рН буфера.

Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ из эритроцитов в пересчете на гемоглобин рассчитывали по формуле:

$$A(\text{Hb}) = A/\text{Hb} , \quad (4)$$

где: A(Hb)- активность фермента в пересчете на гемоглобин

A – активность фермента;

Hb – содержание гемоглобина.

Активность фермента выражают в единицах в мин на грамм Hb.

2.6 Статистические методы исследования

В программе MS Excel после получения результатов исследования была построена база данных, на основе которой при помощи пакета прикладной программы “Statistica 7,0” производился статистический анализ. Для всех данных определяли медиану (Me) и интерквартильный разброс в виде подсчета 25- (C₂₅) и 75-перцентилей (C₇₅). Статистическую достоверность гипотезы двух выборок проводили непараметрическим методом с критерием Манна-Уитни [47]. По результатам статистики были построены таблицы и использованы в графиках.

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ - аденозин-5'-трифосфат

АДФ - аденозин-5'-дифосфат

Г6ФДГ - глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа

ГР - глутатионредуктаза

ЛДГ - лактатдегидрогеназа

Обр. ЛДГ - обратная реакция лактатдегидрогеназы (анаэробная)

ПДК – предельно допустимая концентрация

НАД⁺ - никотиамидадениндинуклеотид окисленный

НАДН - никотиамидадениндинуклеотид восстановленный

НАДФ⁺ - никотиамидадениндинуклеотидфосфат окисленный

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

НАДФН - никотиамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный

Нв - гемоглобин

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. - 2014. - №2.- С.20-23.
2. Грушко, Я. М. Вредные неорганические соединения в промышленных сточных водах / Я.М. Грушко. – Л.: Химия, 1979. – 160 с.
3. Гигиенические критерии состояния окружающей среды. Вып. 36. Фтор и фториды: Пер. с англ.– М.-Женева: Медицина-ВОЗ, 1989. – 114 с.
4. Дампилон, Ж. В. Эколого-экономическая эффективность процессов производства в алюминиевой промышленности (на примере Красноярского алюминиевого завода): автореф. дис. ... канд. экономич. Наук: 08.00.05 / 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. -2014.- №3(91). - Ч.2 - С. 179-185.
6. Николаева, Л. А. Хроническая интоксикация фтором и его соединениями / Л.А. Николаева // Естествознание и гуманизм.– 2015. – 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.- 2016. –V. 2016. – 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.- 2015. –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. 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.

14. Окружающая среда. Энциклопедический словарь-справочник: Немецко-русский словарь по охране окружающей среды: пер. с нем. – М.: Прогресс, 1993 . – 640 с

15. Калетина, Н.И. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов /Н.И. Калетина - М.: ГЭОТАР - Медиа, 2009. - С.907-911.

16. Держинский, Ф. Я. Сравнительная анатомия позвоночных животных / Ф.Я. Держинский. - М.: Аспект Пресс, 2005.- С. 153-185.

17. Зайчик А.Ш., Основы патохимии / Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. - СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2001. - 687 с.

18. 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.

19. Dirks, B.: The benefits of water fluoridation/ Dirks B.// Caries Res. - 2016.- №8.- P. 2-15.
20. Шалина, Т. И. Общие вопросы токсического действия фтора / Шалина Т.И., Васильева Л.С. // Сибирский медицинский журнал. – 2009. – № 5. – С. 5–8.
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. - 2017. - Vol. 56. - № 6. - P.273-276.
22. Калетина, Н.И. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов /Н.И. Калетина - М.: ГЭОТАР - Медиа, 2009. - С.907-911.
23. Inkielewicz-Stepniak, I. Effect of exposure to fluoride and acetaminophenb 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.
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. – 2015. – № 1. – С. 23–26.
25. Свинолупова, Л. С. Ответные реакции растений ячменя на действие фторида натрия / Свинолупова Л. С., Огородникова С. Ю., Ашихмина Т. Я.// Вестник Алтайского государственного аграрного университета.- 2012.-№12.-С. 17-20.
26. Дроганова, Т. С. Активность кислой фосфатазы в печени живородки речной (*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.
27. 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.


28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. Dirks, B.: The benefits of water fluoridation/ Dirks B.// Caries Res. - 1974.- №8.- P. 2-15.
33. Плэмбек, Дж. Электрохимические методы анализа/ Плэмбек Дж. - М.: Мир, 1985. - 496 с.
34. 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.
35. 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.
36. Алехина, Д. А. Экспериментальное исследование субхронического воздействия фторида натрия на компоненты редокс-сишальной системы: автореф. дис. ... канд.биол.наук: 14.03.03 / Алехина Дарья Александровна.- Новосибирск., 2017. – 24 с.

37. 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.
38. 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.
39. Сапин, М.Р. Анатомия человека / М.Р. Сапин, Г.Л. Билич.- М.: Оникс, 2007.- 512 с.
40. Campbell, A. D. Determination of fluoride in various matrices / A.D. Campbell // Pure & App. Chem.- 1987.- Vol. 59.- №. 5, P. 695-702.
41. Zuo, H. Toxic effects of fluoride on organisms / Zuo H. [et al.] // Life Sciences.- 2018.- Vol. 198.- P. 18-24.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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.

46. 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.

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
« 18 » июня 2018г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Метаболические изменения в организме лабораторных мышей
разных возрастов под влиянием фторида натрия

06.04.01 Биология

06.04.01.05 Реконструктивная биоинженерия

Научный руководитель	 подпись, дата	доцент, к.б.н. должность, ученая степень	Ю.С. Аكوпова инициалы, фамилия
Выпускник	Леску - 14.06.18 подпись, дата		И.Б. Лескова инициалы, фамилия
Рецензент	 подпись, дата	доцент, к.б.н. должность, ученая степень	И.С.Коротченко инициалы, фамилия

Красноярск 2018