

Алехина Дарья Александровна

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СУБХРОНИЧЕСКОГО
ВОЗДЕЙСТВИЯ ФТОРИДА НАТРИЯ
НА КОМПОНЕНТЫ РЕДОКС-СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ**

14.03.03 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2017

Работа выполнена в лаборатории экспериментальных гигиенических исследований Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний» (г. Новокузнецк), в лаборатории адаптационной медицины факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Жукова Анна Геннадьевна

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор

Сазонтова Татьяна Геннадьевна

Официальные оппоненты:

кандидат биологических наук
заведующая лабораторией
фармакологии нейропротекции
ФГБНУ «Научно-исследовательский
институт фармакологии им. В.В. Закусова»
Российской академии наук

Антипова Татьяна Алексеевна

доктор биологических наук
ведущий научный сотрудник лаборатории
фармакологических исследований ФГБУН
«Новосибирский институт органической
химии им.Н.Н.Ворожцова» СО РАН

Сорокина Ирина Васильевна

Ведущая организация:

Федеральное государственной бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (г. Москва)

Автореферат разослан «___» _____ 2017 года

Защита диссертации состоится «21» июня 2017 года в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 001.048.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (Новосибирск) по адресу: ул. Тимакова, 2, г. Новосибирск, 630117

Тел/факс: +7 (383) 333-64-56

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке учреждения и на сайте http://centercem.ru/nauchnaya_deyatelnost/dissertacionnyj_sovet/

Учёный секретарь

диссертационного совета

доктор биологических наук



Пальчикова Н.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. 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 (Плахотник В.Н., 1998; Шалина Т.И., Васильева Л.С., 2009; Агалакова Н.И., Гусев Г.П., 2011; Мусийчук Ю.И. с соавт., 2012). 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, а также имеющих профессиональные контакты с ними.

Степень разработанности темы исследования. Действие фторида натрия как системного патогенетического фактора достаточно хорошо изучено. Так, высокие его концентрации и хроническое действие вызывают в первую очередь повреждение костной ткани (Измеров Н.Ф. с соавт., 2012). Кроме того, при хронической фтористой интоксикации выявлены изменения в бронхолёгочной, сердечно-сосудистой (Мухамеджанов Р.Ш., 2004; Филимонов С.Н. с соавт., 2004; Рослая Н.А. с соавт., 2012) и эндокринной системах (Токарь В.И. с соавт., 1991; Шалина Т.И., Васильева Л.С., 2009). Однако недостаточно исследованы внутриклеточные механизмы, запускающие патофизиологические изменения в различных органах на ранних и поздних сроках субхронического действия фторида натрия.

В последнее десятилетие появляются работы о повреждающем действии соединений фтора не только на органном уровне, но и на внутриклеточные структуры и процессы. Так, хроническое действие фторида натрия повышает уровень активных форм кислорода и активизирует свободнорадикальные процессы (Коньк У.В. с соавт., 2001; Гаврилюк Л.А. с соавт., 2007; Garcia-Montalvo E.A. et al., 2009).

В настоящее время показано, что активные формы кислорода не только обладают деструктивными свойствами, но и служат важными регуляторами различных клеточных функций, таких как пролиферация, биосинтез гормонов, метаболические процессы, апоптоз и другие (Зенков Н.К. с соавт., 2009). Под действием различных стимулов в клетках образуются активные формы кислорода, которые являются мессенджерами для передачи сигнала к клеточному ядру (Semenza G.L., 1999; Chandel N.S., Schumacker P.T., 2000; Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В., 2007). Так, под действием АФК в клетках происходит активация таких редокс-чувствительных элементов, как факторы транскрипции NF- κ B (Турпаев К.Т., 2002), AP-1 (Maulik N. et al., 1999), p53 (Чумаков П.М., 2008), HIF-1 α , HIF-3 α (Wiesener M.S.

et al., 1998; Semenza G.L., 2000; 2002), Nrf2 (Shih A.Y. et al., 2003; Purdom-Dickinson S.E. et al., 2007), индуцирующих синтез различных защитных белков. В отношении субхронического воздействия фторида натрия среди этих белков особый интерес представляет фактор транскрипции, индуцируемый гипоксией – HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor), который активирует более 100 генов. Показано, что неспецифическими белками ответа на АФК-сигнал и активацию фактора транскрипции HIF-1 α являются ферменты антиоксидантной защиты и белки семейства HSP (Maulik N. et al., 1999; Peng J. et al., 2000). Однако данных о влиянии фтора на уровни HIF-1 α и конститутивных и индуцибельных белков семейства HSP мало, и они получены лишь на моделях с длительным действием его высоких концентраций. Так, высокие дозы фторида натрия снижают уровень HIF-1 α (Otsuki S. et al., 2005) с дальнейшим изменением активности внутриклеточных защитных систем (Chen Q. et al., 2009; Basha M.P., Sujitha N.S., 2011). Наряду с этим, отсутствуют данные об органоспецифических особенностях изменения свободнорадикальных процессов и их влияния на внутриклеточную редокс-чувствительную систему ядерного фактора HIF-1 α , экспрессируемых белков семейства HSP и антиоксидантных ферментов в динамике субхронического воздействия фторида натрия.

Цель исследования: изучить механизмы влияния субхронического воздействия фторида натрия на компоненты редокс-сигнальной системы в разных органах.

Задачи исследования:

1. При субхроническом воздействии фторида натрия исследовать активацию свободнорадикального окисления и внутриклеточных защитных белков (фактора транскрипции HIF-1 α , белков семейства HSP и антиоксидантных ферментов), как основных компонентов редокс-сигнальной системы.

2. Изучить органоспецифические особенности экспрессии фактора транскрипции HIF-1 α , конститутивных (HSC73 и HOx-2) и индуцибельных (HSP72 и HOx-1) белков семейства HSP, ферментов антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы и каталазы в динамике субхронического воздействия фторида натрия.

3. Изучить влияние субхронического воздействия фторида натрия на характер метаболических и морфологических изменений в сердце, лёгких и печени.

Научная новизна. Впервые в эксперименте в динамике субхронического воздействия фторида натрия выявлена активация компонентов редокс-сигнальной системы – свободнорадикального окисления, фактора транскрипции HIF-1 α , HSP72, HSC73, HOx-1, HOx-2 и ферментов антиоксидантной защиты.

Впервые показано, что органоспецифическая индукция фактора транскрипции HIF-1 α , конститутивных (HSC73 и HOx-2) и индуцибельных (HSP72 и HOx-1) белков семейства HSP, ферментов антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы и каталазы повышает устойчивость организма к субхроническому действию фторида натрия. Высокий уровень этих внутриклеточных защитных белков на ранних сроках фтористого воздействия (3-и сутки – 3 недели) обеспечивает компенсаторную перестройку метаболизма в тканях, повышает устойчивость мембранных структур сердца, лёгких и печени к свободнорадикальному окислению.

Показано, что нарушение баланса между прооксидантными и антиоксидантными факторами на поздних сроках субхронического воздействия

фторида натрия (6-12 недель) вызывает резкую активацию свободнорадикального окисления, снижение уровня внутриклеточных защитных белков и активности ферментов основных метаболических путей, что приводит к значительным структурным изменениям в органах. При этом устойчивость к длительному действию фторида натрия снижается в ряду лёгкие > сердце > печень.

Теоретическая и практическая значимость работы: показано изменение уровней различных компонентов редокс-сигнальной системы (свободнорадикального окисления, фактора транскрипции NIF-1 α , белков семейства HSP и антиоксидантных ферментов) в динамике субхронического действия фторида натрия. На основе изучения изменения уровня фактора транскрипции NIF-1 α , белков HSP72, HSC73, HOx-1, HOx-2, антиоксидантных ферментов и их участия в регуляции свободнорадикального окисления в разных органах углублены представления о клеточных патогенетических механизмах действия соединений фтора на организм, что может иметь практическое значение для разработки эффективных способов органопротекторной профилактики. Кроме того, полученные данные могут быть использованы в практике научных исследований в данной области.

Работа выполнена по плану Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний» в рамках темы НИР № 049 «Изучение закономерностей и механизмов влияния факторов производственной среды и трудового процесса на здоровье работников алюминиевой промышленности» (номер государственной регистрации 0120.0 810694).

Материалы диссертации используются в образовательном процессе Новокузнецкого института (филиала) ФГБОУ ВПО «Кемеровский государственный университет»; в научно-исследовательской и клинической практике Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний».

Положения, выносимые на защиту:

1. Субхроническое воздействие фторида натрия активирует компоненты редокс-сигнальной системы в тканях крыс, что выражается в повышении уровня свободнорадикального окисления и фактора транскрипции NIF-1 α , конститутивных (HSC73, HOx-2) и индуцибельных (HSP72, HOx-1) белков семейства HSP и ферментов антиоксидантной защиты – СОД и каталазы. Экспрессия внутриклеточных белков имеет органоспецифичный характер и увеличивается в ряду органов: для фактора транскрипции NIF-1 α – сердце < лёгкие < печень; для HSP72 – печень < лёгкие < сердце; для HSC73 – сердце < лёгкие < печень; для HOx-1 – лёгкие < сердце < печень; для HOx-2 – лёгкие < сердце < печень. Высокий уровень этих защитных белков в лёгких сохраняет устойчивость мембранных структур к свободнорадикальному окислению на физиологическом уровне, а в сердце и печени – повышает её.

2. Увеличение уровня ядерного фактора транскрипции NIF-1 α и индуцируемых им белков семейства HSP на ранних сроках воздействия фторида натрия (1-3 недели) сопровождается приспособительной перестройкой метаболизма в тканях: в сердце и лёгких повышается активность ферментов, обеспечивающих работу цикла Кребса (аспартатаминотрансфераза), липидного (гидроксibuтиратдегидрогеназа) и белкового (γ -глутамилтрансфераза) обмена, а в печени активируется фермент

глюкозо-аланинового шунта (аланинаминотрансфераза). На морфологическом уровне действие фторида натрия на ранней стадии характеризуется минимальными изменениями в органах.

3. На поздних сроках субхронического воздействия фторида натрия (6-12 недель) на фоне активации свободнорадикального окисления, снижения антиоксидантной защиты и признаков патологической перестройки метаболических процессов, выявлены органоспецифические деструктивные изменения, степень которых наиболее выражена в печени.

Апробация работы. Основные положения работы были доложены и обсуждены на Всероссийских научных конференциях с международным участием «Гигиена, организация здравоохранения и профпатология» (Новокузнецк, 2012; 2013), «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (Новосибирск, 2011; 2013; 2015), «Производственно-обусловленные нарушения здоровья работников в современных условиях» (Шахты, 2010), «Общие закономерности формирования профессиональных и экологически обусловленных заболеваний: патогенез, диагностика, профилактика (Ангарск, 2014); на Всероссийской научной конференции молодых учёных «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2010; 2012); на международной научно-практической конференции «Науки о Земле, биоразнообразии и проблемы его сохранения, экологическая безопасность. Перспективы развития естественнонаучного образования», Новокузнецк (2015).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 19 работ, из них 8 в рецензируемых изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации для публикации основных научных результатов диссертации.

Личный вклад. Автор принимал непосредственное участие в проведении экспериментов на лабораторных животных, в подготовке материалов для гистологического анализа, в выполнении биохимических и биофизических исследований. Автором самостоятельно проведён поиск и анализ литературы, статистическая обработка полученных данных, оформление диссертационной работы и автореферата.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 103 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, глав «Результаты исследований и их обсуждение», заключения, выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 85 отечественных и 170 иностранных источников. Иллюстративный материал представлен в 11 таблицах и на 11 рисунках.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 205 белых крысах-самцах Вистар массой 200-250г, выращенных в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде, а также естественном чередовании суточной освещённости. Содержание животных и проведение экспериментов проводилось в соответствии с международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» (Страсбург, 1986), «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ № 755 от 12.08.1977; приказ № 1179 от 10.10.83).

Рандомизацию животных осуществляли методом случайных чисел. Крысы были разделены на 2 группы: контрольную и группу животных с субхроническим воздействием фторида натрия в течение 12 недель. Ежедневно крысы получали в свободном доступе раствор фторида натрия в концентрации 10 мг/л, что примерно в 10 раз ниже LD50 (крыса массой в среднем 250 г за сутки выпивает около 30 мл воды: $10:1000 \times 30 = 0,3$ мг фтора на крысу = 1,2 мг/кг).

Для изучения субхронического воздействия фторида натрия на компоненты редокс-сигнальной системы, осуществляли забор тканей сердца (желудочки), лёгких и печени (левая доля) после декапитации крыс под эфирным наркозом на 3-и, 6-ые сутки и через 3, 6, 9 и 12 недель эксперимента. Ткани замораживали в жидком азоте, где хранили до исследования. Сердца и лёгкие измельчали гомогенизатором Ultra-Turrah TP-18/10 ножом 25N-10 при 8000 об/мин в течение 20 сек (2 раза по 10) с интервалом 15 сек в среде, содержащей 50 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl (pH 7,2 при 0°C) в соотношении ткань:среда равном 1:8 для сердца и 1:10 для лёгких. Ткань печени измельчали гомогенизатором тефлон-стекло при 800 об/мин в течение 1 мин в стандартной среде гомогенизирования при соотношении ткань:среда, равном 1:12.

В тканях (сердце, лёгкие, печень) определяли:

– **уровень внутриклеточных защитных белков – фактора транскрипции *HIF-1 α*** , конститутивных форм белков – *HSC73*, *гем-оксигеназы-2 (HOx-2)* и индуцибельных – *HSP72*, *HOx-1* методом Western-блот анализа. Белки разделяли в 8 или 10% полиакриламидном геле и переносили на PVDF мембрану с помощью электроэлюции. Использовали первые моноклональные антитела к *HIF-1 α* , *HSPs* и *HOx-1,2* (Stressgen, Канада; Santa Cruz, США) (1:1000) и вторые антитела, конъюгированные с пероксидазной меткой (Jackson Immuno Research) (1:2000). Детекцию проводили по хемилюминесценции с использованием реактивов ECL (Amersham) на рентгенографическую пленку (Kodak). Плёнку проявляли и фиксировали, используя фотографические реактивы. Об уровне *HIF-1 α* , *HSC73*, *HOx-2*, *HSP72* и *HOx-1* судили по плотности окрашивания полосы связывания антител с белком. Количественная обработка полученных иммуоблотов проводилась путём сканирования и обработки с помощью компьютерной программы Photoshop. Результаты выражали в относительных денситометрических единицах (ODE);

– **резистентность мембранных структур тканей к активации свободнорадикального окисления** – гомогенаты сердца, лёгких и печени инкубировали при 37°C в присутствии аскорбата (0,2-0,75 мМ) при концентрации белка не выше 2,5 мг/мл (Архипенко Ю.В. с соавт., 1989; Ланкин В.З. с соавт., 1999). Концентрацию свободнорадикальных продуктов оценивали по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) по классическому методу (Ohkawa H. et al., 1979) в модификации (Kikugawa K. et al., 1992);

– **активность ферментов антиоксидантной защиты** определяли спектрофотометрически на спектрофотометре Cintra 10e GBC: **каталазы** по потреблению H_2O_2 , регистрируемому при 240 нм (Luck H., 1963); **общей супероксиддисмутазы (СОД)** по ингибированию образования супероксидного анион-радикала (Fridovich I., 1971) в системе ксантин (0,1 мМ) – ксантиноксидаза (0,004 ед.);

– **активность ферментов** АсАТ, АлАТ, ЛДГ, ГБДГ, ЩФ, и γ -ГТ унифицированными методами с помощью наборов реактивов ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск) на фотометре РМ-750 (Robert Riele, Германия). Изменение активности этих ферментов в тканях анализировали с использованием функционального подхода (Хочачка П., Сомеро Дж., 1988; Нельсон Д., Кокс М., 2014). Так: АсАТ – аспаргатаминотрансфераза: обеспечивает поступление субстратов в цикл Кребса, маркер активности митохондрий; АлАТ – аланинаминотрансфераза: обеспечивает работу глюкозо-аланинового шунта; ГБДГ – гидроксibuтиратдегидрогеназа: участвует в обмене липидов; γ -ГТ – γ -глутамилтрансфераза: мембранный фермент, участвует в системе детоксикации организма и протеолизе денатурированных белков; ЛДГ – лактатдегидрогеназа: фермент конечной реакции гликолиза; ЩФ (щелочная фосфатаза) – мембранный фермент, осуществляет неспецифическое дефосфорилирование, влияя на уровень фосфатов в биологических средах (Рослый И.М. с соавт., 2002; 2010; Фокина Е.Г., Рослый И.М., 2013).

В отдельной серии экспериментов после декапитации крыс, которая проводилась под эфирным наркозом, забирали образцы сердца, лёгких и печени для **гистологического исследования**. На ротационном микротоме МЗП-01 (Россия) готовили срезы толщиной 5-7 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином и по Ван Гизону для выявления эластических и коллагеновых волокон (Коржевский Д.Э., 2005). Микроскопирование гистологических препаратов проводилось на «Nicon Eclipse E 200», с передачей цифрового изображения на монитор и обработкой в программе «Bio Vision 4.0». Данная часть исследования выполнена совместно с научным сотрудником научно-исследовательской лаборатории патанатомии НГИУВ филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО Бугаевой Марией Сергеевной, за что мы ей искренне признательны.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ STATISTICA 6.0 согласно рекомендациям по проведению биомедицинской статистики (Гланц С., 1999; Платонов А.Е., 2000). Для сравнения независимых выборок использовали непараметрический Mann-Whitney U Test. Различия между выборками считались статистически значимыми при $P \leq 0,05$ или, в ряде случаев, $P \leq 0,01$. Результаты экспериментов на рисунках (2, 4 и 5) и в таблицах (2, 4 и 6) представлены в виде медианы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Влияние субхронического воздействия фторида натрия на компоненты редокс-сигнальной системы и активность ферментов основных метаболических путей в миокарде крыс

Фторид натрия при длительном действии и в высоких концентрациях обладает кардиотоксическим действием – являясь прооксидантом, он повышает уровень АФК в клетке и ингибирует внутриклеточные защитные системы, что ведёт к повреждению ткани миокарда (García-Montalvo E.A. et al., 2009).

В наших экспериментах субхроническое поступление фторида натрия изменяло уровень внутриклеточных белков редокс-чувствительной сигнальной системы в миокарде крыс (рис.1).

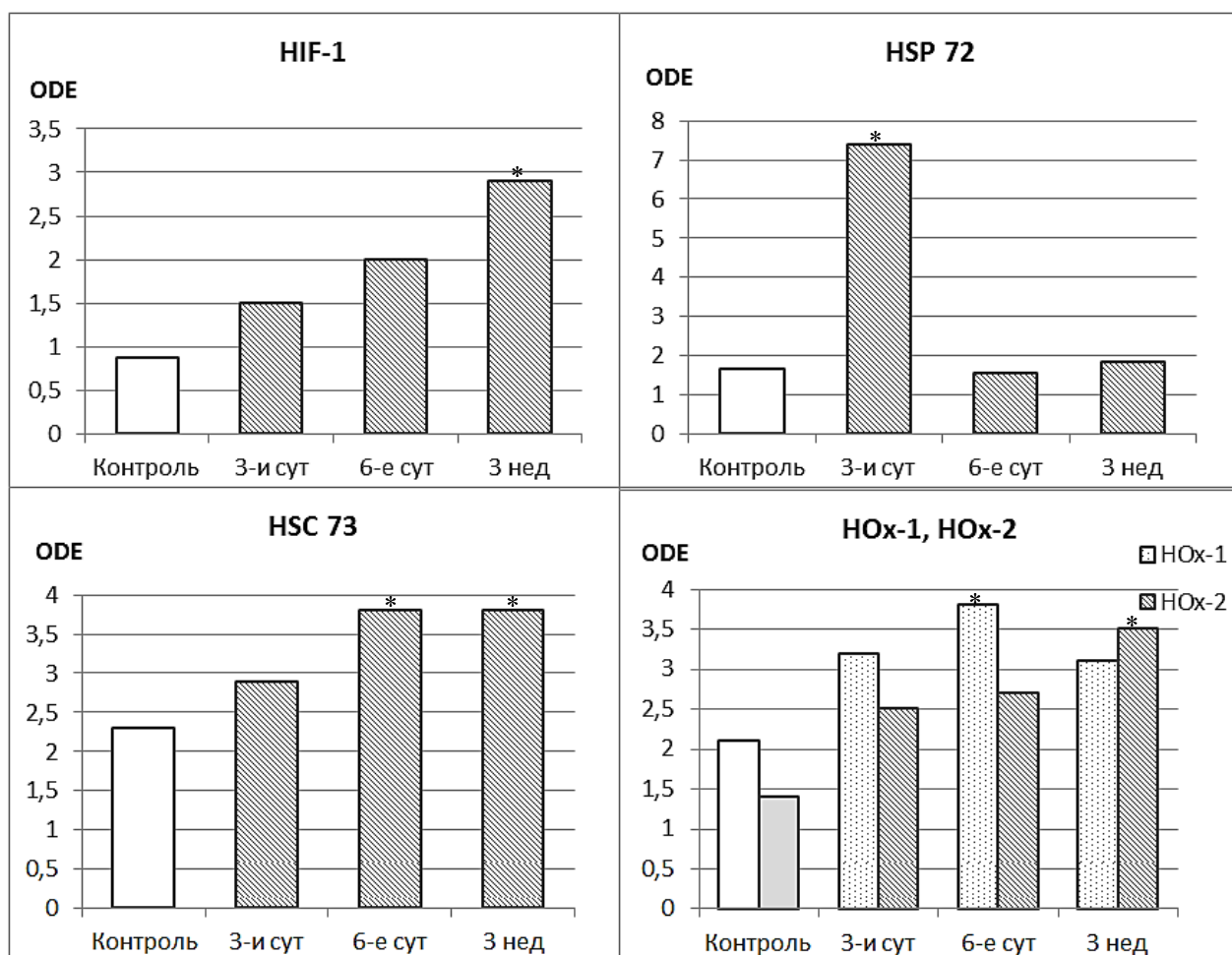


Рис. 1. Уровень защитных белков в миокарде экспериментальных крыс при субхроническом действии фторида натрия (определено методом Western-блот анализа).

Примечание: ODE – относительные денситометрические единицы; * – достоверность отличий ($P \leq 0,05$) по сравнению с контролем (Mann-Whitney U test).

Так к 3 неделе эксперимента в 3,3 раза повышался уровень фактора транскрипции HIF-1 α . Поскольку HIF-1 α в разных органах запускает синтез специфических и неспецифических белков (Semenza G.L., 2000; 2007) оценили уровень конститутивных HSC73 и HOx-2, и индуцибельного HSP72 при субхроническом действии фторида натрия. Видно, что повышение уровня HIF-1 α в миокарде крыс сопровождается экспрессией конститутивных HSC73 и HOx-2, отражающих в значительной степени наличие гипоксической компоненты. Синтез этих белков проходил нелинейно, но непрерывно и достигал максимума к 3 неделе, увеличиваясь в 1,7 и 2,5 раза, соответственно (рис. 1). Возможно, непрерывный синтез HSC73 и HOx-2 связан с адаптационными изменениями в сердце, поскольку HOx-2 защищает кардиомиоциты от свободнорадикального окисления (Zhukova A.G., Sazontova T.G., 2004; Han F. et al., 2010), а HSC73 необходим в качестве шаперона для вновь синтезируемых белков и отражает степень гипоксических нарушений (Андреева Л.И., 2009).

Более быстрая реакция на действие фторида натрия выявлена для индуцибельного HSP72, что отражает стрессорную реакцию. Видно, что на 3-и сутки он достигал максимума (увеличивался в 4,4 раза), а на 6-ые сутки и через 3 недели приближался к контрольным значениям. Ранее для HSP72 было показано срочное

реагирование на стрессорное (Сазонтова Т.Г. с соавт., 2015; Sazontova T.G., Arkhipenko Y.V., 2011) и гипоксическое воздействие (Сазонтова Т.Г. с соавт., 2007) и быстрое снижение экспрессии при возвращении клетки в нормальное состояние (Тихонова Н.С. с соавт., 2008), что характерно для стресс-индуцибельных белков при реоксигенации. Помимо HSP72 в ответе на субхроническое действие фторида натрия участвуют ферменты антиоксидантной защиты.

Таблица 1.

Активность ферментов антиоксидантной защиты в миокарде крыс при субхроническом воздействии фторида натрия

Сроки эксперимента	СОД, у.е./г белка		Каталаза, мкМ Н ₂ O ₂ /мин/г белка	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
3-и сутки	1,75- 1,89 -2,24	2,40- 2,81 *-3,10	2,32- 2,33 -2,34	2,49- 2,67 *-2,90
6-ые сутки	1,52- 1,88 -2,29	1,63- 1,63 -2,17	1,97- 2,15 -2,22	2,24- 2,32 -2,32
3 недели	1,50- 1,78 -2,23	2,10- 2,79 *-3,50	1,87- 1,98 -2,46	2,33- 2,61 *-2,73
6 недель	1,11- 1,53 -2,12	1,83- 2,38 *-3,92	2,31- 2,42 -2,51	2,13- 2,48 -2,71
9 недель	1,75- 2,10 -2,51	2,67- 3,12 *-3,41	1,59- 1,66 -1,74	2,27- 2,44 *-2,53
12 недель	1,95- 2,48 -2,71	1,51- 1,62 *-1,80	1,69- 2,02 -2,39	1,77- 2,13 -2,4

Примечание: * – достоверность отличий ($P \leq 0,05$) по сравнению с контролем (Mann-Whitney U test); медиана выделена полужирным, указаны верхний и нижний квартили.

Так из табл. 1 видно, что в миокарде на 3-и сутки активность СОД и каталазы превышала контрольный уровень на 49% и 15%, на 6-ые сутки снижалась до контроля, а через 3 недели регистрировалось новое увеличение их активности – на 57% и 32%, соответственно.

Увеличение уровня HIF-1 α коррелировало с изменением активности ферментов, ответственных за поддержание метаболизма в ткани сердца (табл. 2).

Таблица 2.

Активность ферментов основных метаболических путей в миокарде крыс при субхроническом воздействии фторида натрия

Сроки эксперимента	АсАТ (ЕА/г тк)		ЩФ (ЕА/г тк)		ЛДГ (ЕА/г тк)		ГБДГ (ЕА/г тк)		γ -ГТ (ЕА/г тк)	
	К	Опыт	К	Опыт	К	Опыт	К	Опыт	К	Опыт
3-и сутки	112,4	128,0*	56,2	100,9*	1297	2753*	1705	3154*	1,03	0,96
6-ые сутки	112,4	110,0	56,2	29,5*	1297	3003*	1705	458*	1,03	1,33
3 недели	113,2	113,3	61,5	57,8	1171	1405*	1444	2270*	1,06	1,03
6 недель	107,0	105,6	57,0	83,9*	1256	2734*	1681	1917	0,99	0,95
9 недель	114,3	128,3*	52,7	49,2	1129	990*	1774	1632	1,08	0,6*
12 недель	113,9	137,3*	58,3	49,2	1199,3	671,2*	1756,1	2109*	0,96	1,79*

Примечание: данные представлены в виде медианы; К – контроль; * – достоверность отличий ($P \leq 0,05$) по сравнению с контролем (Mann-Whitney U test).

Видно, что на ранних сроках действия фторида натрия – с 3 суток по 3 неделю – повышался уровень АсАТ, ЛДГ, ЩФ, ГБДГ и γ -ГТ, свидетельствуя об активации основных метаболических путей, направленных на обеспечение энергией нормальной работы сердца. При этом активация ферментов этих метаболических путей имела нелинейный характер и достигала максимума в разные временные интервалы. Так, активность ЛДГ, как и уровень фактора транскрипции HIF-1 α , на 3-

и, 6-ые сутки и через 3 недели действия фторида натрия последовательно нарастает. Активность АсАТ увеличивается на 14% только на 3-и сутки, а γ -ГТ на 39% на 6-ые сутки эксперимента. ЩФ и ГБДГ проходят через две волны активации – на 3-и сутки превышают контрольный уровень в 1,8 раза, на 6-ые сутки снижаются, а через 3 недели вновь зарегистрировано увеличение активности – ЩФ до контрольных значений, а ГБДГ на 32%.

Таким образом, при поступлении в организм фторида натрия от 3-х суток до 3 недель в миокарде крыс повышается уровень внутриклеточных защитных белков – HIF-1 α , HSP72, HSC73, HOx-2, СОД и каталазы, и активность ферментов основных метаболических путей. Такое увеличение уровня защитных белков обеспечивает снижение интенсивности свободнорадикальных процессов в кардиомиоцитах.

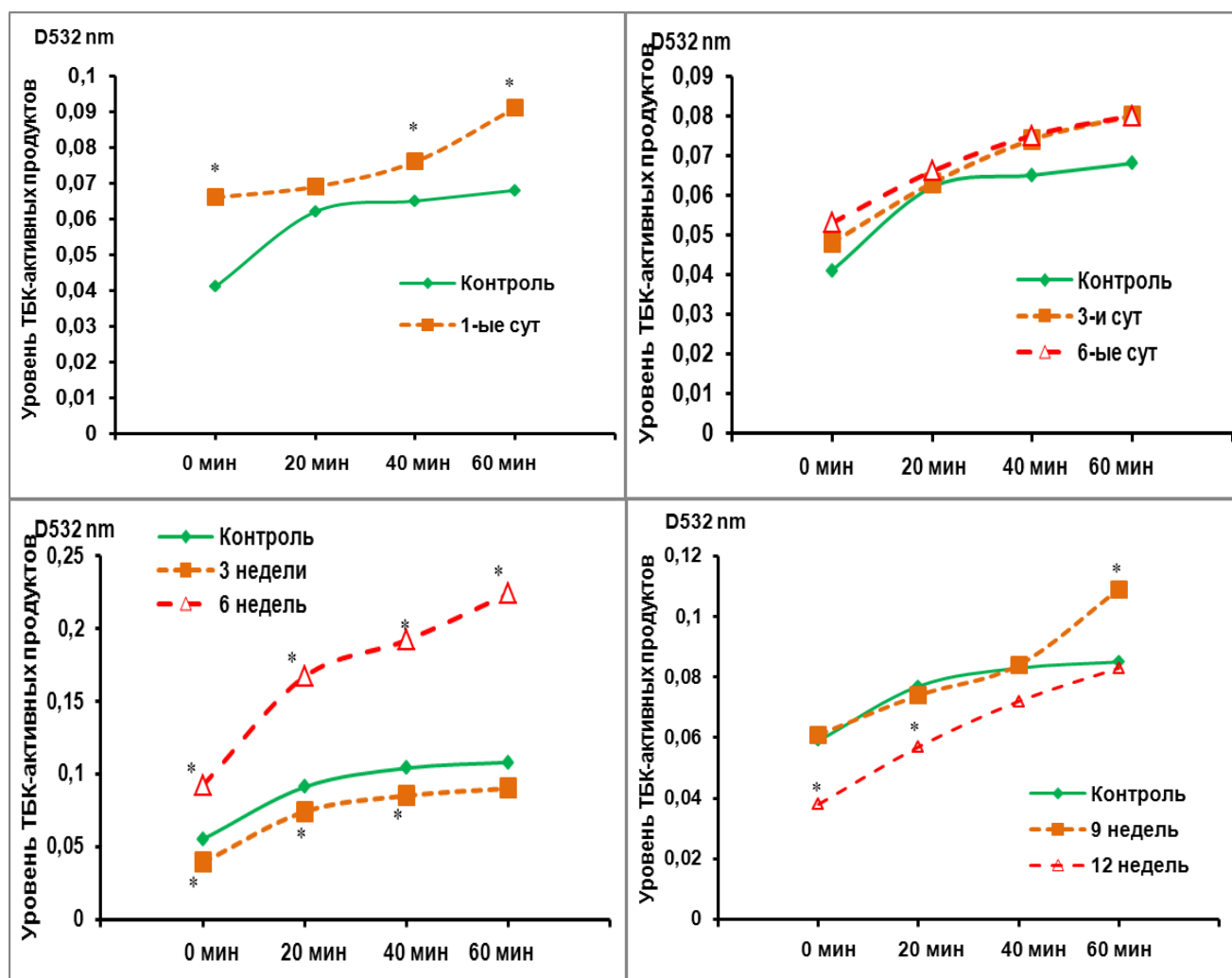


Рис. 2. Влияние субхронического действия фторида натрия на чувствительность мембранных структур миокарда к индукции свободнорадикального окисления *in vitro*.

Примечание: D – оптическая плотность при 532 nm; 0 мин, 20 мин, 40 мин, 60 мин – время окисления, индуцированного *in vitro*; * – достоверность отличий ($P \leq 0,05$) по сравнению с контролем (Mann-Whitney U test); данные представлены в виде медианы.

Действительно, в 1-ые сутки субхроническом действии фторида натрия наблюдалась активация свободнорадикальных процессов (рис. 2) – увеличивались начальный уровень продуктов окисления на 60% и чувствительность мембранных структур миокарда к индукции свободнорадикального окисления *in vitro* (40 мин индукции окисления на 17%, через 60 мин – на 34%).

Однако к 3 неделе чувствительность мембранных структур миокарда к индукции свободнорадикального окисления *in vitro* не отличалась от контрольных значений (см. рис. 2), что подтверждает компенсаторный характер значительной активации защитных систем, в том числе и антиоксидантных, обнаруженный на этих сроках исследования.

Увеличение сроков действия фторида натрия больше 3 недель приводило к разнонаправленным изменениям ферментов антиоксидантной защиты (см. табл.1). Так, активность СОД увеличивалась на 6 и 9 неделях в 1,6 и 1,5 раза, а на 12 неделе снижалась в 1,5 раза по сравнению с контролем. Активность каталазы была повышена на 47% только на 9 неделе эксперимента. Несмотря на значительную активацию антиоксидантной системы, снижалась устойчивость мембран кардиомиоцитов к действию АФК. Так, на 6 и 9 неделе действия фторида натрия повышалась чувствительность миокарда к индукции свободнорадикального окисления (см. рис.2). Однако к 12 неделе эксперимента зарегистрировано снижение интенсивности свободнорадикальных процессов, по сравнению с контролем (см. рис.2). Это может быть связано с одной стороны со снижением в мембранах миокарда уровня жирнокислотных остатков фосфолипидов, являющихся субстратом свободнорадикального окисления (Архипенко Ю.В., 1992), а с другой с накоплением при стрессорных воздействиях различных растворимых цитоплазматических факторов, оказывающих значительный защитный эффект на мембраны (Мацкевич А.А., Сазонтова Т.Г., 1999).

Показано, что интоксикация фтором индуцирует в сердце синтез *de novo* 21 белка (Lu J. et al., 2009), среди них *c-fos* и *c-myc* (Zhang W.L. et al., 2003), белки-регуляторы апоптоза Bcl-2, Bcl-xL, Bax (J.-H. Lee et al., 2008), митоген-активируемые протеинкиназы, различные шаперонины группы GroL (Lu J. et al., 2009). Это позволяет сохранять структурную целостность и функциональную активность кардиомиоцитов. В частности, как показано в этой работе, об этом свидетельствует увеличение в 1,9 раза активности мембраносвязанного фермента γ -ГТ в миокарде на 12 неделе субхронического действия фторида натрия (см. табл. 2).

Таким образом, на поздних сроках действия фторида натрия (с 6 недели) в ткани сердца была выявлена активация свободнорадикальных процессов, которая в данном случае выполняет регулируемую роль в развитии компенсаторных механизмов (Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В., 2007). Так, поддержание гомеостаза на этих сроках исследования в ткани сердца осуществлялось следующими метаболическими путями (см. табл. 2): **1)** на 6 неделе за счёт усиления гликолиза и вовлечения фосфатов в биоэнергетические процессы кардиомиоцитов – увеличена активность ЛДГ в 2,2 раза и ЩФ – в 1,5 раза; **2)** на 9 и 12 неделях за счёт активации цикла Кребса – увеличена активность АсАТ и усиления роли липидного обмена в метаболизме – активность ЛДГ снижена на фоне увеличения активности ГБДГ в 2 раза. Эти данные свидетельствуют об изменениях в обмене веществ в миокарде преимущественно компенсаторного характера, которые направлены на поддержание функциональной активности кардиомиоцитов.

Выявленные изменения на молекулярном уровне подтверждаются данными гистологических исследований ткани миокарда. Показано, что на ранних сроках субхронического действия фторида натрия (1-3 недели) в сердечной мышце выявлены минимальные морфологические изменения в виде полнокровия,

утолщения стенок крупных артерий мышечно-эластического типа, вероятно в связи с отёком, и слабовыраженной лимфоцитарной инфильтрацией периваскулярных и межмышечных пространств. На 6-12 неделях, на фоне выраженных компенсаторно-приспособительных процессов в миокарде выявлены патологические нарушения – деструктивные изменения в кардиомиоцитах (васкулярная дистрофия), что соответствует данным полученным на моделях с другими экспериментальными животными и у людей (Власова О.В., 2003; Мухамеджанов Р.Ш. с соавт., 2003; Рослая Н.А. с соавт., 2012). На уровне целого органа выявленные изменения могут проявляться снижением сократительной способности миокарда (Рябушко Н.Н., 2001).

Таким образом, в ткани сердца на субхроническое воздействие фторида натрия развивается ответная реакция от компенсаторной – физиологический ответ – до повреждающей. На ранних сроках – 3-и сутки – 3 недели – в сердце показана активация компонентов редокс-сигнальной системы – NIF-1 α , HSP72, HSC73, HOx-2 и ферментов антиоксидантной защиты. Активация редокс-сигнальной системы приводит к снижению интенсивности свободнорадикальных процессов и компенсаторным изменениям энергетического обмена в миокарде, в результате чего на физиологическом уровне поддерживаются структура и функции кардиомиоцитов. С 6 по 9 неделю действия фторида натрия значительная активация свободнорадикального окисления в сердце изменяет спектр ферментов основных метаболических путей и с антиоксидантными функциями. На 12 неделе на фоне достаточных компенсаторных реакций развиваются морфологические изменения в сердце, которые могут привести к необратимому снижению функций кардиомиоцитов.

2. Влияние субхронического воздействия фторида натрия на компоненты редокс-сигнальной системы и активность ферментов основных метаболических путей в лёгких крыс

Известно, что свободнорадикальные процессы играют значимую роль в молекулярных механизмах патогенеза заболеваний лёгких, что связано с анатомо-физиологическими особенностями органов дыхания (Нестеров Ю.В., Турченко Н.В., 2012; Соодаева С.К., 2012). Так, в лёгких непосредственно осуществляется контакт клеток с кислородом – инициатором и участником окисления. Показано, что баланс прооксидантов и антиоксидантов в ткани лёгких тесно сопряжён с активностью ферментов энергетического обмена, изменение которой может свидетельствовать о начале патологических нарушений. При этом особенности свободнорадикальных реакций и изменение метаболизма в лёгких при субхроническом воздействии фторида натрия остаются малоизученными.

Из рис. 4 видно, что на ранних сроках поступления фторида натрия в организм резистентность мембранных структур лёгких к индукции свободнорадикального окисления не снижена от контроля.

Такая компенсация свободнорадикальных процессов в лёгких сопровождалась значительной активацией внутриклеточных защитных систем, как белков срочного ответа, так и ферментов антиоксидантной защиты (рис.3, табл. 3).

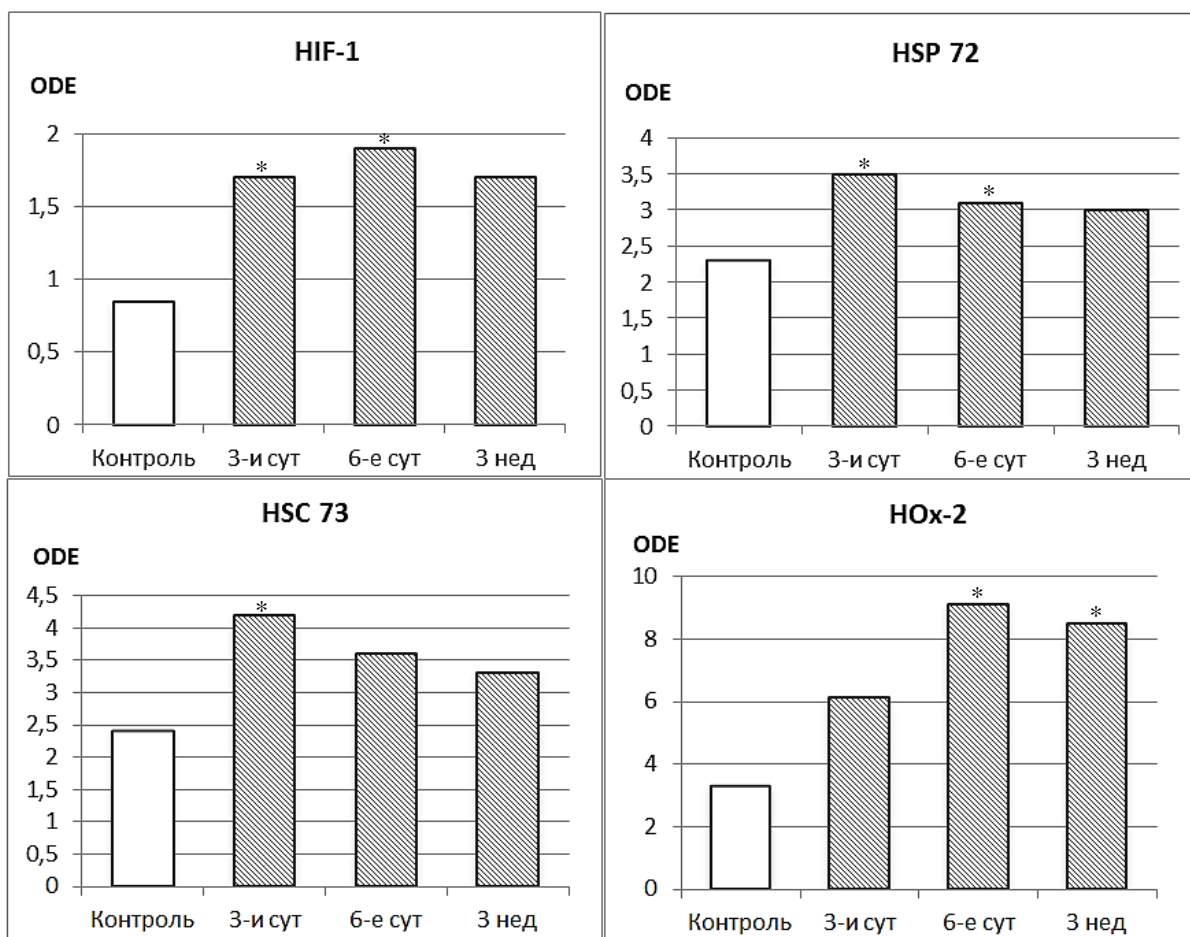


Рис. 3. Уровень защитных белков в ткани лёгких экспериментальных крыс при субхроническом действии фторида натрия (определено методом Western-блот анализа). **Примечание:** ODE – относительные денситометрические единицы; * – достоверность отличий ($P \leq 0,05$) по сравнению с контролем (Mann-Whitney U test).

Таблица 3.

Активность ферментов антиоксидантной защиты в лёгких крыс при субхроническом воздействии фторида натрия

Сроки эксперимента	СОД, у.е./гр. белка		Каталаза, мкМ H_2O_2 /мин/гр. белка	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
3-и сутки	2,2 - 3,1 - 4,8	2,3 - 3,1 - 5,5	4,8 - 5,1 - 5,4	5,3 - 6,0* - 6,5
6-ые сутки	1,5 - 1,8 - 1,9	2,3 - 2,6 - 3,9	2,7 - 2,8 - 3,0	4,4 - 4,6* - 4,8
3 недели	1,2 - 1,5 - 1,7	1,3 - 1,4 - 1,6	3,5 - 4,4 - 4,6	2,6 - 3,1* - 3,0
6 недель	1,7 - 2,1 - 2,4	1,6 - 2,2 - 3,6	3,8 - 4,2 - 5,0	3,7 - 4,9 - 6,1
9 недель	1,6 - 2,1 - 2,3	1,9 - 2,3 - 2,6	3,7 - 4,4 - 4,9	4,3 - 4,6 - 5,1
12 недель	1,8 - 2,0 - 2,3	2,2 - 2,6* - 2,8	3,6 - 4,0 - 4,7	4,5 - 5,2* - 5,7

Примечание: * – достоверность отличий ($P \leq 0,05$) по сравнению с контролем (Mann-Whitney U test); медиана выделена полужирным, указаны верхний и нижний квартили.

Видно, что уже на 3-и сутки действия фторида натрия зарегистрирован высокий уровень HIF-1 α (увеличен в 2 раза), который сохранялся до 3 недели эксперимента. При этом экспрессия защитных белков HSP72, HSC73 и HOx-2 в лёгких происходит в соответствии с динамикой индукции фактора транскрипции HIF-1 α (см. рис. 3).

Активность антиоксидантного фермента – каталазы повышалась на 3-и и 6-ые сутки, а к 3 неделе действия фторида натрия снижалась (см. табл. 3).

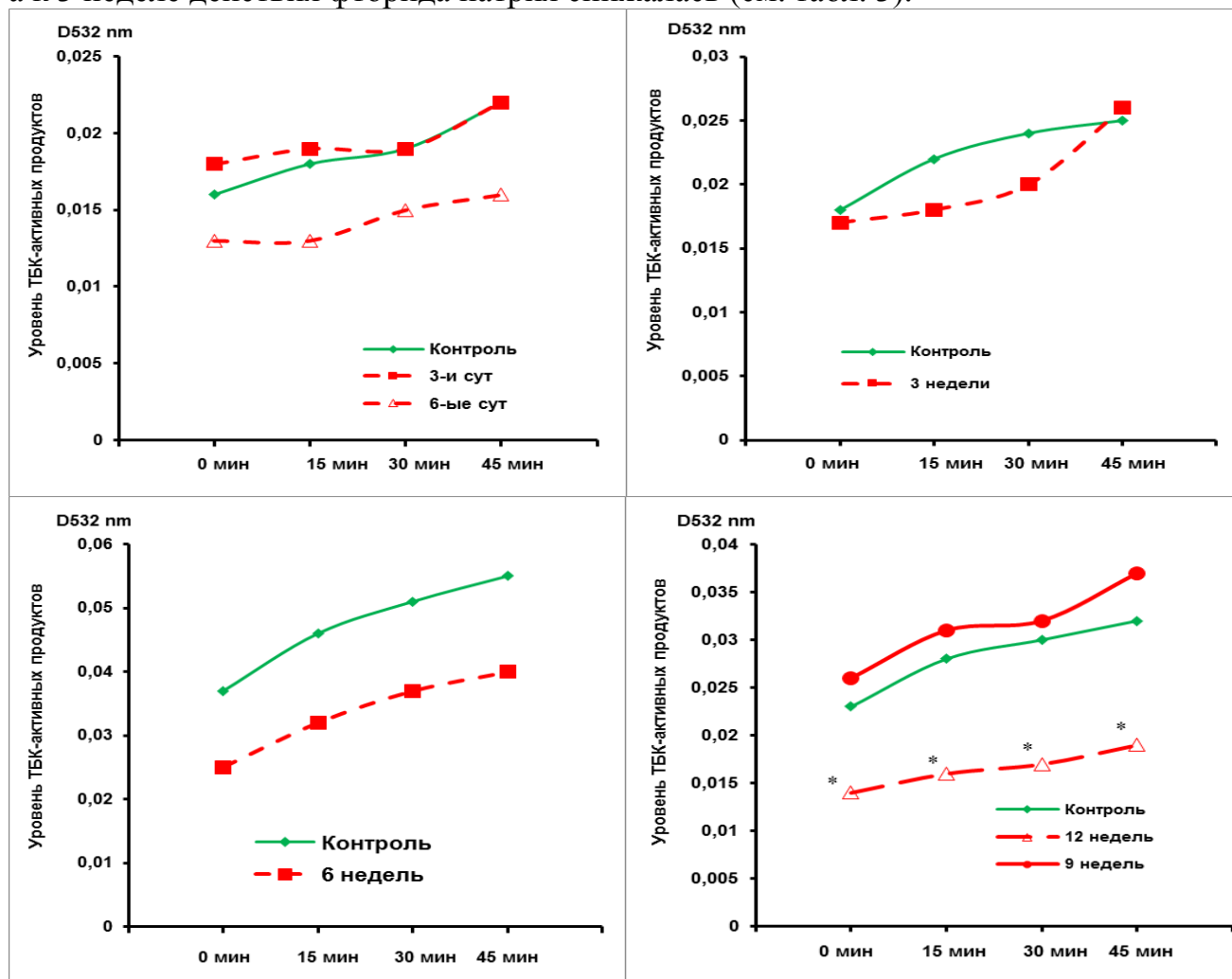


Рис. 4. Влияние фторида натрия на чувствительность мембранных структур ткани лёгких к индукции свободнорадикального окисления *in vitro*.

Примечание: D – оптическая плотность при 532 nm; 0 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин – время окисления, индуцированного *in vitro*; данные представлены в виде медианы.

Рост уровня внутриклеточных защитных белков на ранних сроках действия фторида натрия в лёгких сопровождался изменением интенсивности функционирования ферментов основных метаболических путей (табл. 4). Так, на 3-и и 6-ые сутки резко увеличивалась активность АсАТ (в 4-12 раз), свидетельствуя о значительной активации цикла Кребса и окислительного фосфорилирования в митохондриях. Изменение активности АсАТ коррелировало с уровнем стресс-индуцибельного белка HSP72, действие которого направлено в том числе на поддержание функции митохондрий (Андреева Л.И., 2002). На 6-ые сутки зарегистрировано снижение активности АлАТ (в 1,4 раза) и γ -ГТ (в 1,4 раза) по сравнению с контролем, что возможно направлено на сохранение в лёгких пула аминокислот для поддержания синтеза защитных белков. Действительно на этом сроке исследования почти в 3 раза повышен уровень НОx-2 – белка участвующего в защите организма от гипоксических повреждений (рис. 3). На 3 неделе активность этих ферментов вернулась к контрольным значениям, что может свидетельствовать о метаболической адаптации к действию повреждающего фактора.

Продолжение действия фторида натрия на организм больше 3 недель приводит к развитию патологических изменений в ткани лёгкого. Так, начиная с 6 недели по 12 неделю, подавляется активность цикла Кребса – активность АсАТ была снижена в 4-5 раз по сравнению с контролем. Известно, что при энергодефицитных состояниях происходит накопление в клетке АМФ (Suska M., 2001; Adamek E. et al., 2005) и активируется АМФ-зависимая протеинкиназа, которая фосфорилирует белки, участвующие в транспорте глюкозы, реакциях гликолиза и окисления жирных кислот (Kola B. et al., 2006).

Таблица 4.

Активность ферментов основных метаболических путей в лёгких крыс при субхроническом воздействии фторида натрия

Сроки эксперимента	АсАТ (ЕА/г тк)		АлАТ (ЕА/г тк)		ЩФ (ЕА/г тк)		γ-ГТ (ЕА/г тк)		ЛДГ (ЕА/г тк)	
	К	Опыт	К	Опыт	К	Опыт	К	Опыт	К	Опыт
3-и сутки	1,51	7,10*	0,52	0,48	377,7	434,5*	7,2	6,9	621,5	689,1
6-ые сутки	1,55	21,30*	0,53	0,37*	378,5	374,8	6,8	4,9*	623,8	550,2
3 недели	1,94	2,10	0,50	0,48	379,4	301,0*	7,1	5,3	607,2	652,2
6 недель	1,56	0,48*	0,52	0,55	404,8	419,3	7,0	2,3*	504,1	1285,2*
9 недель	1,82	0,65*	0,53	0,47	435,9	414,1	6,9	6,0	544,6	683,6
12 недель	1,95	0,39*	0,52	0,68*	381,4	405,5	7,2	7,9	622,4	687,9

Примечание: данные представлены в виде медианы; К – контроль; * – достоверность отличий ($P \leq 0,05$) по сравнению с контролем (Mann-Whitney U test).

Действительно из табл. 4 видно, что на 6 неделе действия фторида натрия в 2,5 раза увеличивалась активность ЛДГ – фермента конечной реакции гликолиза. Активация гликолиза на этом сроке эксперимента частично компенсирует недостаток АТФ, но при этом вызывает быстрое накопление в тканях лактата и ацидоз, что может приводить к его аутоингибированию (Оковитый С.В., 2004). В соответствии с этим активность ЛДГ на 9 и 12 неделях снижалась до контрольных значений. Кроме того, энергодефицит вызывает модификацию клеточных мембран, в частности изменяет состав липидного бислоя (Vang Y.N. et al., 2000; Aydin G. et al., 2003) и активность мембранных ферментов. Так, на 6 неделе действия фторида натрия в лёгких выявлено значительное снижение (в 3 раза) активности мембраносвязанного фермента γ-ГТ. На 12 неделе зарегистрирован компенсаторный рост АлАТ (увеличение в 1,3 раза по сравнению с контролем) и восстановление до контрольных значений активности ЩФ и γ-ГТ (см. табл. 4), что имеет адаптивный характер и подтверждается снижением в лёгких интенсивности свободнорадикального окисления (см. рис. 4). Такое повышение резистентности мембранных структур лёгких на 12 неделе субхронического действия фторида натрия могло происходить за счёт увеличения в 1,3 раза активности антиоксидантных ферментов СОД и каталазы (см. табл. 3), а кроме того окисления жирнокислотных остатков фосфолипидов мембран.

Изменения в лёгких на молекулярном уровне согласуются с морфологией. В начальный период воздействия фторида натрия (1-3 неделя) в лёгких наблюдали лимфоцитарную инфильтрацию с примесью эозинофилов, утолщение мышечного слоя бронхов и стенок сосудов лёгких. Начиная с 6 недели, в лёгких выявлены дистрофические изменения альвеолярного эпителия, которые к 12 неделе

приобретают масштабный характер. Кроме того, наблюдали утолщение альвеолярных перегородок, отложение в интерстиции лёгких волокнистой соединительной ткани, периваскулярный отёк.

Таким образом, в лёгких при субхроническом воздействии фторида натрия развиваются компенсаторно-приспособительные реакции: на контрольном уровне поддерживаются свободнорадикальные процессы, что связано с активацией компонентов редокс-сигнальной системы. К 3 неделе увеличивается уровень HIF-1 α , HSP72, HSC73 и HOx-2, а к 12 неделе повышается активность СОД и каталазы. Поддержание свободнорадикальных процессов на контрольном уровне до 12 недели опосредует компенсаторно-приспособительные изменения на морфологическом уровне и в активности ферментов основных метаболических путей в лёгких. С 12 недели в органе выявлены выраженные патологические процессы, которые имеют необратимый характер.

3. Влияние субхронического воздействия фторида натрия на компоненты редокс-сигнальной системы и активность ферментов основных метаболических путей в печени крыс

Печень играет важную роль в белковом, углеводном и липидном обмене и обезвреживании токсических веществ, в том числе является одним из органов-мишеней хронического действия соединений фтора (Wang Y.N. et al., 2000; Wei W. et al., 2013; Pereira H. et al., 2013), что сопровождается развитием окислительного стресса, обусловленного избыточным образованием АФК. Однако, в настоящее время малоизвестно об изменении соотношения антиоксидантных систем и свободнорадикальных процессов, а также активности ферментов основных метаболических путей в ткани печени при субхроническом действии фторида натрия, что и явилось задачей исследования в данном разделе.

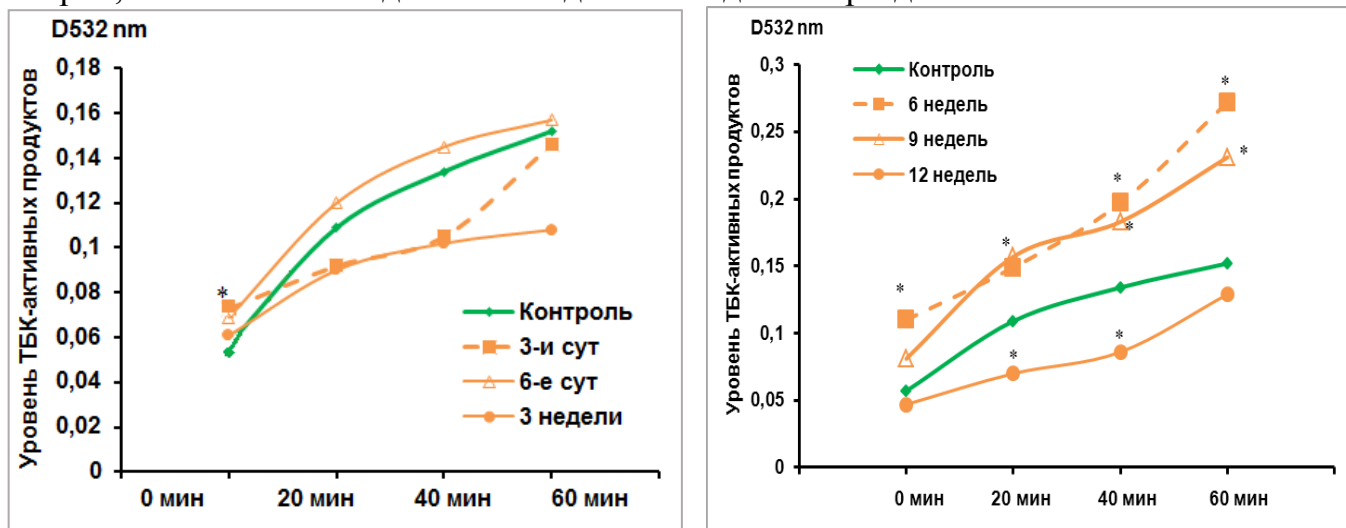


Рис. 5. Влияние фторида натрия на чувствительность мембранных структур печени к индукции свободнорадикального окисления *in vitro*.

Примечание: * – достоверность отличий ($P \leq 0,05$) по сравнению с контролем (Mann-Whitney U test); D – оптическая плотность при 532 nm; 0 мин, 20 мин, 40 мин, 60 мин – время окисления, индуцированного *in vitro*; данные представлены в виде медианы.

Из рис. 5 видно, что на 3-и сутки действия фторида натрия в печени в 2 раза увеличивался начальный уровень свободнорадикальных продуктов. При этом

резистентность мембранных структур гепатоцитов не отличалась от контрольных значений, что может быть связано с активацией редокс-сигнальной системы под действием АФК.

Подтверждением этого явилось увеличение экспрессии фактора транскрипции HIF-1 α , которое приводило к росту HSP72, HSC73, HOx-1 и HOx-2 (рис. 6). Так, на третьи сутки эксперимента зарегистрированы максимальные уровни HSP72, HSC73, HOx-1 и HOx-2. На 6-е сутки действия фторида натрия в печени активность свободнорадикальных процессов не отличалась от контрольных значений и до исходного уровня, снижался уровень HSP72, HOx-1 и HOx-2.

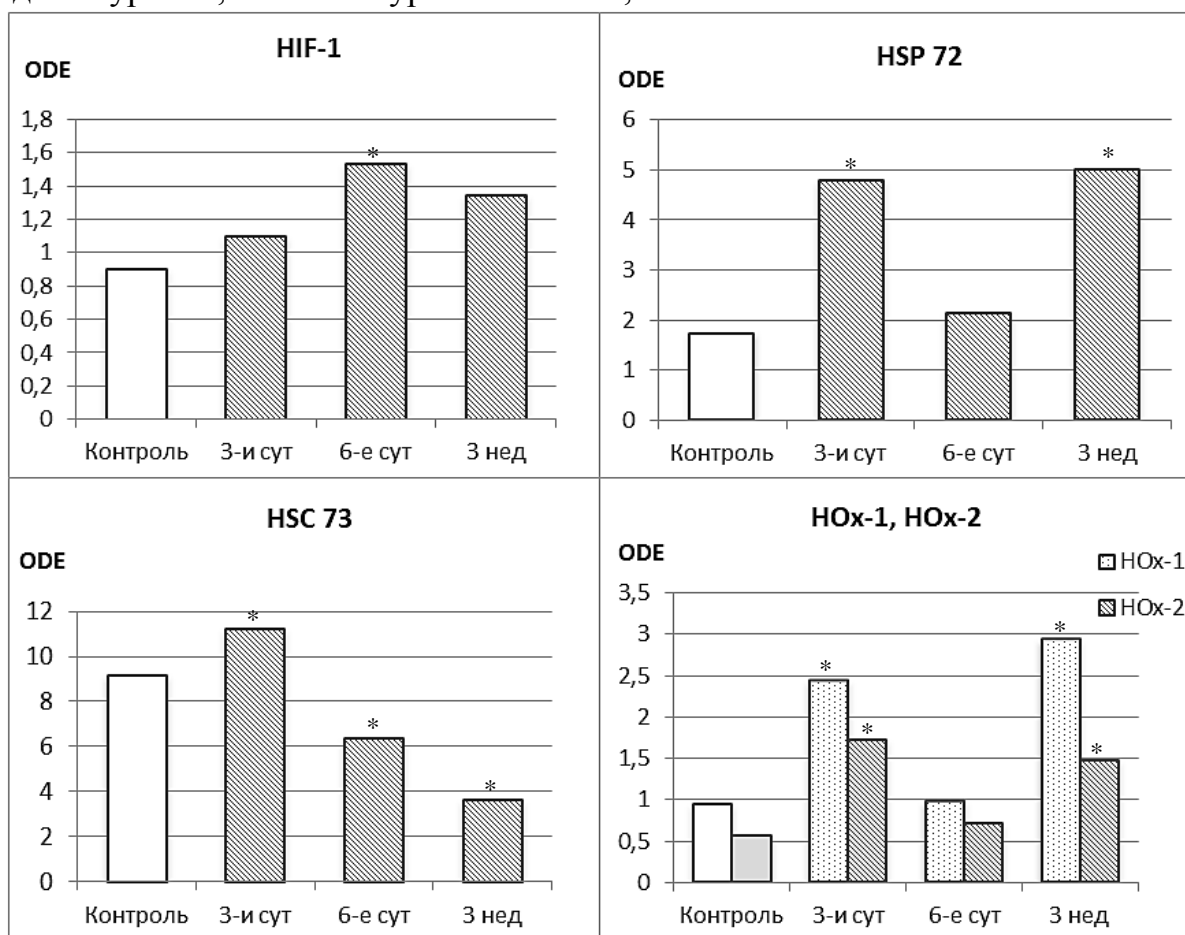


Рис. 6. Уровень защитных белков в печени экспериментальных крыс при действии фторида натрия (определено методом Western-блот анализа).

Примечание: ОДЕ – относительные денситометрические единицы; * – достоверность отличий ($P \leq 0,05$) по сравнению с контролем (Mann-Whitney U test).

В последнее время показано (Евдонин А.Л., Медведева Н.Д., 2009), что различные стрессорные воздействия увеличивают внутриклеточный уровень белков семейства HSP70 и стимулируют их выход из тканей, в том числе из печени во внеклеточное пространство и кровотока. Можно предположить, что снижение уровня HSP72, HOx-1 и HOx-2 в цитозоле печени на 6-е сутки действия фторида натрия связано с таким выходом. При выходе во внеклеточную среду белки семейства HSP оказывают ряд эффектов на клетки системы врождённого иммунитета – HSP72 стимулирует синтез и секрецию провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 β и IL-6 (Lee S.W. et al., 2014), а HOx – противовоспалительного IL-10 (Otterbein L.E. et al., 2000). На модели кратковременного действия высоких концентраций фтора было

показано, что изменение уровня HSP72 идёт параллельно с секрецией в кровь на 6-ых сутках провоспалительного TNF α , а увеличение HOx-1 и HOx-2 на 3-и сутки и через 3 недели с синтезом провоспалительных IL-4 и IL-10 (Михайлова Н.Н. с соавт., 2013).

Помимо активации белков семейства HSP транскрипционный фактор NIF-1 α оказывает триггерное влияние на ферменты антиоксидантной защиты в печени (табл. 5). Так активность СОД и каталазы нарастала в течение первой недели действия фторида натрия и превышала контрольные значения на 3-и сутки в 1,6 и 1,8 раза, а на 6-ые сутки – в 2,6 и в 2 раза, соответственно. На 3 неделе эксперимента выявлен высокий уровень NIF-1 α , HOx-1, HOx-2 и HSP72, в результате чего на контрольном уровне поддерживается резистентность мембранных структур печени к индукции свободнорадикального окисления (см. рис. 5).

Таблица 5.

Активность ферментов антиоксидантной защиты в печени крыс при субхроническом воздействии фторида натрия

Сроки эксперимента	СОД, у.е./г белка		Каталаза, мкМ Н ₂ О ₂ /мин/г белка	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
3-и сутки	0,21 – 0,27 – 0,33	0,41– 0,44* – 0,52	16,0 – 18,7 – 36,7	33,0 – 33,5* – 33,6
6-ые сутки	0,36 – 0,37 – 0,39	0,95 – 0,98* – 1,04	16,3 – 18,5 – 34,5	13,7 – 38,0* – 48,6
3 недели	0,69 – 1,11 – 1,26	0,75 – 0,85 – 1,23	24,0 – 43,2 – 44,9	29,9 – 39,65 – 55,9
6 недель	0,34 – 0,37 – 0,49	0,25 – 0,25* – 0,31	11,1 – 12,6 – 17,0	13,0 – 13,9 – 14,8
9 недель	0,42 – 0,50 – 0,83	0,6 – 1,15* – 1,59	23,6 – 26,8 – 36,3	40,6 – 52,4* – 70,9
12 недель	0,40 – 0,51 – 0,85	0,21 – 0,45 – 0,76	33,9 – 36,7 – 37,1	15,6 – 43,3 – 51,3

Примечание: * – достоверность отличий ($P \leq 0,05$) по сравнению с контролем (Mann-Whitney U test); медиана выделена полужирным, указаны верхний и нижний квартили.

Одновременно с активацией синтеза защитных белков при субхроническом действии фторида натрия происходило изменение активности ферментов основных метаболических путей в печени (табл. 6). Видно, что на ранних сроках изменялась активность АсАТ, АлАТ, ЩФ и ЛДГ. Изменение активности этих ферментов носило нелинейный характер. Так, на 3-и и 6-ые сутки снижалась активность АсАТ, ЩФ, ЛДГ и увеличивалась активность АлАТ. Увеличение активности АлАТ обеспечивает работу глюкозо-аланинового шунта, тогда как снижение АсАТ свидетельствует о торможении цикла Кребса в печени. Низкая активность ЛДГ может быть связана с дефицитом субстрата – молочной кислоты, а также с сигнальной ролью фактора транскрипции NIF-1 α , который опосредует изменения в активности гликолитических ферментов, в результате чего уменьшается скорость потребления глюкозы и уменьшается накопление лактата (Weidemann A., Johnson R.S., 2008). К 3 неделе эксперимента до контрольных значений восстанавливалась активность АсАТ и ЛДГ; в 1,5 раза повышалась активность ЩФ и почти в 2 раза, по сравнению с третьими сутками эксперимента, снижалась активность АлАТ. Эти данные соответствуют результатам Pereira S. с соавт. (2013), полученным на модели кратковременного действия высоких концентраций фторида натрия, которые показали ингибирование ферментов цикла Кребса и компенсаторное увеличение активности ферментов гликолиза. Помимо регуляции активности ферментов энергетического обмена NIF-1 α

в митохондриях усиливает синтез субъединицы цитохром-с-оксидазы-2 и протеазы, разрушающей субъединицу цитохром-с-оксидазы-1. Эти изменения замедляют передачу электронов по дыхательной цепи и приводят к оптимизации дыхательного комплекса митохондрий IV (Simon M.C., 2006; Semenza G.L., 2007). В результате образование АФК снижается, что подтверждается нашими данными по устойчивости мембранных структур печени к индукции свободнорадикального окисления (рис. 5).

Таким образом, на ранних сроках действия фторида натрия (3-и сутки – 3 недели) в печени происходит активация компонентов редокс-сигнальной системы – увеличивается уровень внутриклеточных защитных белков HIF-1 α , HOx-1, HOx-2 и HSP72. В результате этого реализуются адаптивные механизмы, направленные на поддержание свободнорадикальных процессов на контрольном уровне.

Таблица 6.

Активность ферментов основных метаболических путей в печени крыс при субхроническом воздействии фторида натрия

Сроки эксперимента	АсАТ (ЕА/г тк)		АлАТ (ЕА/г тк)		ЩФ (ЕА/г тк)		γ -ГТ (ЕА/г тк)		ЛДГ (ЕА/г тк)	
	К	Опыт	К	Опыт	К	Опыт	К	Опыт	К	Опыт
3-и сутки	52,4	33,9*	76,8	100,5*	750,7	497,6*	14,8	13,1	702,5	647,4
6-ые сутки	51,3	42,8	70,3	50,1	781,1	772,8	15,3	13,2	677,6	394,2*
3 недели	52,9	52,6	80,4	61,3*	703,5	1204,4*	15,7	16,7	690,6	653,1
6 недель	55,7	102,9*	82,2	47,8*	804,8	779,5	14,7	14,0	688,6	421,6*
9 недель	51,7	49	80,3	91,5	786,4	735,3	14,3	26,0*	706,5	471,5
12 недель	52,2	11,6*	77,9	68,2	790,2	1045,2*	14,8	14,3	693,4	1440,0*

Примечание: данные представлены в виде медианы; К – контроль; * – достоверность отличий ($P \leq 0,05$) по сравнению с контролем (Mann-Whitney U test).

Увеличение сроков поступления фторида натрия в организм больше 3 недель приводило к разнонаправленным изменениям метаболизма в ткани печени. Начиная с 6 недели, происходило смещение прооксидантного и антиоксидантного равновесия в сторону активации свободнорадикальных процессов (см. табл. 5, рис. 5) – снижалась активность СОД на 32% и в 1,8 раза повышалась чувствительность мембранных структур печени к индукции свободнорадикального окисления *in vitro*. Это подтверждается и данными об ингибировании синтеза защитных белков HIF-1 α и HSP72, полученными на модели длительного действия высоких концентраций фтора (Chen Q. et al., 2009). На 9 неделе, несмотря на повышение активности СОД и каталазы в 2 раза, в печени увеличен начальный уровень продуктов свободнорадикального окисления и снижена резистентность мембранных структур в 1,4 и 1,3 раза, соответственно. На 12 неделе поступления фторида натрия в организм в печени зарегистрирована низкая интенсивность свободнорадикальных процессов, что возможно связано со снижением уровня жирнокислотных остатков фосфолипидов, являющихся субстратом свободнорадикального окисления. Это подтверждается данными Wang Y.N. с соавт (2000) о снижении уровня полиненасыщенных и увеличении насыщенных жирных кислот – пальмитиновой и стеариновой в мембранах гепатоцитов при длительном действии высоких концентраций фтора.

Значительная активация свободнорадикальных процессов в сочетании с

недостаточностью компенсаторных возможностей антиоксидантных и других защитных систем свидетельствуют о патологических изменениях в печени, что было подтверждено на примере ферментов основных метаболических путей. Так, на 6 неделе субхронического воздействия фторида натрия в 1,8 раза повышалась активность АсАТ на фоне снижения активности АлАТ и ЛДГ в 1,7 и 1,6 раза, соответственно (см. табл. 6). К 12 неделе активность АсАТ снижалась в 4,5 раза, тогда как активность ЛДГ повышалась в 2 раза по сравнению с контролем. К этому сроку исследования в 1,3 раза повышалась активность ЩФ. Активность мембраносвязанной γ -ГТ, участвующей в транспорте аминокислот в клетки и в системе детоксикации организма, повышалась в 1,8 раза только на 9 неделе эксперимента. Эти данные свидетельствуют о невозможности достижения метаболического баланса и развитии патологических изменений в ткани печени на поздних сроках субхронического воздействия фторида натрия на организм.

Результаты гистологических исследований печени, подтверждают данные полученные на молекулярном уровне. Так, на ранних сроках действия фторида натрия (1-3 недели) были выявлены минимальные морфологические изменения в виде активации клеток Купфера, вакуольной дистрофии гепатоцитов и полнокровия сосудов. На поздних сроках (начиная с 6 недели) патологические процессы начинают резко усугубляться – выявлены очаги некрозов гепатоцитов, что видимо, обусловлено активацией свободнорадикальных процессов, и на 12 неделе воздействия фторида натрия локусы фиброзных волокон.

Таким образом, печень является высокочувствительным органом к субхроническому воздействию фторида натрия. При этом основными повреждающими факторами на молекулярном уровне являются изменение энергетического обмена, активация свободнорадикальных процессов и снижение уровня внутриклеточных защитных систем. На морфологическом уровне изменения в печени до 6 недели субхронического воздействия фторида натрия имели незначительный характер. С 6 недели в органе выявлены патологические изменения в виде выраженной дистрофии гепатоцитов, появления очагов некроза, фибропластических изменений в портальных трактах.

Таким образом, на основе комплексного изучения активации различных компонентов редокс-сигнальной системы в сердце, лёгких и печени расширены представления о патогенетических механизмах субхронического воздействия фторида натрия на молекулярном и морфологическом уровнях. Полученные результаты имеют практическое значение для разработки эффективных способов органопротекторной профилактики и коррекции в зависимости от органоспецифических особенностей и длительности действия фторида натрия. Регистрация роста уровня внутриклеточных защитных белков и свободнорадикального окисления может явиться прогностическим критерием, свидетельствующим об активации неспецифического ответа на фактор повреждающей природы, пролонгация действия которого может привести в дальнейшем к срыву физиологической адаптационной защиты организма и потребовать введения дополнительных профилактических и коррекционных процедур.

ВЫВОДЫ

1. Субхроническое воздействие фторида натрия активирует компоненты редокс-сигнальной системы – свободнорадикальное окисление, фактор транскрипции HIF-1 α , конститутивные (HSC73, HOx-2) и индуцибельные (HSP72, HOx-1) белки семейства HSP и ферменты антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазу и каталазу. Увеличение уровня этих защитных белков свидетельствует о важности неспецифического ответа на фтористую интоксикацию.

2. Обнаружены органоспецифические особенности активации редокс-сигнальной системы в ответ на субхроническое воздействие фторида натрия. Экспрессия защитных внутриклеточных белков увеличивается в ряду органов: для фактора транскрипции HIF-1 α – сердце < лёгкие < печень; для HSP72 – печень < лёгкие < сердце; для HSC73 – сердце < лёгкие < печень; для HOx-1 – лёгкие < сердце < печень; для HOx-2 – лёгкие < сердце < печень. Высокий уровень этих белков в лёгких сохраняет устойчивость мембранных структур к свободнорадикальным процессам на физиологическом уровне, а в сердце и печени – повышает её.

3. Увеличение уровня HIF-1 α и защитных белков семейства HSP на ранних сроках субхронического воздействия фторида натрия (3-и сутки – 3 недели) обеспечивает адаптивную перестройку метаболизма в тканях: в сердце и лёгких повышается активность ферментов, обеспечивающих работу цикла Кребса (аспартатаминотрансфераза), липидного (гидроксибутиратдегидрогеназа) и белкового (γ -глутамилтрансфераза) обмена, а в печени активируется фермент глюкозо-аланинового шунта (аланинаминотрансфераза).

4. Поздние сроки (6-12 недель) субхронического воздействия фторида натрия сопровождаются чрезмерной активацией свободнорадикальных процессов, снижением уровня внутриклеточных защитных белков и изменением спектра ферментов основных метаболических путей. В сердце на 6 неделе активируются гликолиз, а на 9 и 12 неделях – цикл Кребса и липидный обмен. В лёгких на 6 неделе активируется гликолиз, а к 12 неделе фтористого воздействия усиливается роль глюкозо-аланинового шунта на фоне ингибирования цикла Кребса. В отличие от этого в печени активация свободнорадикального окисления с 6 недели приводит к разнонаправленным изменениям в ферментативной активности, что свидетельствует о высокой чувствительности этого органа к длительному субхроническому действию фторида натрия.

5. Субхроническое воздействие фторида натрия сопровождается органоспецифическими деструктивными изменениями, степень которых наиболее выражена в печени по сравнению с сердцем и лёгкими.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Михайлова Н.Н. Оценка биохимических изменений периферической крови на ранних стадиях экспериментальной фтористой интоксикации/ Н.Н. Михайлова, Л.Г. Горохова, А.С. Казицкая, Е.Н. Масленникова, Д.А. Щербакова // **Бюллетень ВСНЦ СО РАМН.** – Иркутск, 2010. – № 4 (74). – С. 43-46. (Список ВАК)

2. Ядыкина Т.К. Функционально-метаболический ответ гепатобилиарной системы на фтористую интоксикацию (экспериментальные исследования) / Т.К. Ядыкина, А.Г.

Жукова, Е.В. Уланова, Н.В. Кизиченко, **Д.А. Щербакова**, М.С. Бугаева // **Бюллетень ВСНЦ СО РАМН.** – Иркутск, 2010. – № 4 (74). – С. 64-68. (Список ВАК)

3. Уланова Е.В. Диагностическое значение изменения ферментативной активности печени на ранних стадиях развития флюороза / Е.В. Уланова, Л.Г. Горохова, А.С. Казицкая, Т.К. Ядыкина, **Д.А. Щербакова** // Производственно обусловленные нарушения здоровья работников в современных условиях: Материалы Всероссийской научно-практической конференции. – Шахты, 2010. – С. 330-332.

4. **Щербакова Д.А.** Тканеспецифические особенности реакции организма на фтористую интоксикацию (экспериментальные исследования) / **Д.А. Щербакова** // **Медицинский академический журнал.** – 2010. – Т. 10, № 5. – С. 41. (Список ВАК)

5. Жукова А.Г. Динамика компенсаторных механизмов на ранних стадиях интоксикации фтором / А.Г. Жукова, Е.В. Уланова, **Д.А. Щербакова**, Т.К. Ядыкина // **Технологии живых систем.** – 2011. – Т. 8, № 1. – С. 10-17. (Список ВАК)

6. Жукова А.Г. Особенности синтеза компонентов редокс-сигнальной системы – HIF-1 α , HSP70, HOx-2 и ферментов антиоксидантной защиты на ранних стадиях фтористой интоксикации / А.Г. Жукова, **Д.А. Щербакова**, Е.В. Уланова, Л.Г. Горохова, Т.Г. Сазонтова // **Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов: Материалы пятой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием.** – Новосибирск, 2011. – С.69.

7. Жукова А.Г. Синтез защитных белков в ответ на гипоксию на ранних стадиях фтористой интоксикации / А.Г. Жукова, **Д.А. Алехина**, Е.В. Уланова, А.С. Казицкая, Т.Г. Сазонтова // **Патогенез** – 2011. – №3. — С.34. (VI Российская конференция с международным участием «Гипоксия: механизм, адаптация, коррекция»)

8. **Алехина Д.А.** Тканеспецифичность ответа про- и антиоксидантов при хронической фтористой интоксикации / **Д.А. Алехина**, М.С. Бугаева, Ю.А. Прокопьев, Т.Г. Сазонтова, А.Г. Жукова // **Гигиена, организация здравоохранения и профпатология»** и семинара «Актуальные вопросы современной профпатологии: Материалы XLVII научно-практической конференции с международным участием - Новокузнецк, 2012. – С.4-7.

9. **Алехина Д.А.** Соотношение про- и антиоксидантных систем в ткани печени в динамике фтористой интоксикации / **Д.А. Алехина**, Т.К. Ядыкина, М.В. Зубкова, Н.Н. Михайлова, А.Г. Жукова // **Медицинский академический журнал.** – 2012. – С. 14-17.

10. **Алехина Д.А.** Тканеспецифичность действия промышленных ксенобиотиков на организм / **Д.А. Алехина**, С.В. Климов, Л.Г. Горохова, А.Г. Жукова // **Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов: Материалы шестой Всероссийской научно-практической конференции.** – Новосибирск, 2013. – С.6.

11. **Алехина Д.А.** Влияние неорганических соединений фтора на процессы транскрипции и трансляции в клетке / **Д.А. Алехина**, А.Г. Жукова // **Гигиена, организация здравоохранения и профпатология: Материалы XXVIII научно-практической конференции с международным участием.** – Новокузнецк, 2013. – С.4-6.

12. Жукова А.Г. Механизмы внутриклеточной защиты и активность свободнорадикального окисления в миокарде крыс в динамике хронической фтористой интоксикации / А.Г. Жукова, **Д.А. Алехина**, Т.Г. Сазонтова, Ю.А. Прокопьев, Л.Г. Горохова, Н.В. Стряпко, Н.Н. Михайлова // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2013. – Т. 156. № 8. – С. 190-194. (Список ВАК)

13. Михайлова Н.Н. Особенности внутриклеточных защитных механизмов при действии различных ксенобиотиков / Н.Н. Михайлова, Т.Г. Сазонтова, **Д.А. Алехина**,

А.С. Казицкая, Н.Н. Жданова, Ю.А. Прокопьев, А.Г. Жукова // **Цитокины и воспаление.** – 2013. – № 4. – С.71-76. (Список ВАК)

14. Алехина Д.А. Метаболические изменения и активность свободнорадикальных процессов в лёгких крыс в динамике хронической фтористой интоксикации / **Д.А. Алехина**, М.В. Зубкова, С.В. Климов, А.Г. Жукова // Общие закономерности формирования профессиональных и экологически обусловленных заболеваний: патогенез, диагностика, профилактика: Сборник материалов Всероссийской конференции. – Ангарск-Иркутск, 2014. – С.137-140.

15. Алехина Д.А. Тканеспецифические особенности изменения активности основных ферментов метаболизма в динамике фтористой интоксикации / **Д.А. Алехина**, Н.В. Кизиченко, Л.Г. Горохова, А.Г. Жукова // Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов: Материалы Седьмой Всероссийской научно-практической конференции. – Новосибирск, 2015. – С.10-11.

16. Ядыкина Т.К. Экспериментальные исследования механизмов иммунной защиты в динамике фтористой интоксикации. / Т.К. Ядыкина, Н.Н. Михайлова, Е.В. Уланова, **Д.А. Алехина**, А.Г. Жукова // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17, №5 – С.81. (Материалы научного форума «Дни иммунологии в СПб 2015»).

17. Жукова А.Г. Влияние соединений фтора на клеточный метаболизм / А.Г. Жукова, **Д.А. Алехина**, Л.Г. Горохова // Науки о Земле, биоразнообразии и проблемы его сохранения, экологическая безопасность. Перспективы развития естественнонаучного образования: Сборник трудов международной научно-практической конференции. – Новокузнецк, 2015. – С.31-36.

18. Жукова А.Г. Экспериментальные исследования внутриклеточных защитных механизмов печени в развитии хронической фтористой интоксикации / А.Г. Жукова, Н.Н. Михайлова, Т.К. Ядыкина, **Д.А. Алехина**, Л.Г. Горохова, Д.В. Романенко, М.С. Бугаева // **Медицина труда и промышленная экология.** – 2016. – №5. – С. 21-24. (Список ВАК)

19. Алехина Д.А. Влияние малых доз неорганических соединений фтора на уровень свободнорадикального окисления и внутриклеточных защитных систем в сердце, лёгких и печени / **Д.А., Алехина**, А.Г. Жукова, Т.Г. Сазонтова // **Технологии живых систем.** – 2016. – Т.13, №6. – С.49-56. (Список ВАК)

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АсАТ – аспаргатаминотрансфераза

АлАТ – аланинаминотрансфераза

АФК – активные формы кислорода

ГБДГ – гидроксибутиратдегидрогеназа

γ-ГТ – γ-глутамилтрансфераза

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

СОД – супероксиддисмутаза

HIF-1α (Hypoxia Inducible Factor) – гипоксией, индуцируемый фактор

НОх-1, 2 (Haem oxygenase) – гем-оксигеназа

HSP (Heat Shock Proteins) – белки теплового шока

Соискатель



Алехина Д.А.