

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены
и профессиональных заболеваний»

На правах рукописи

АЛЕХИНА ДАРЬЯ АЛЕКСАНДРОВНА

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени кандидата биологических наук
по специальности: 14.03.03 – патологическая физиология

Научный руководитель:
доктор биологических наук Жукова А.Г.
Научный консультант:
доктор биологических наук, профессор Сазонтова Т.Г.

Новокузнецк – 2017

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
Список сокращений.....	3
Введение.....	4
Глава 1. Обзор литературы	10
1.1. Роль свободнорадикальных процессов и антиоксидантной системы в метаболизме организма	10
1.1.1. Регуляторная роль АФК	10
1.1.2. Внутриклеточные защитные системы	15
1.2. Механизмы физиологического и токсического действия соединений фтора на организм	28
Глава 2. Материалы и методы исследования	44
2.1. Гомогенизирование тканей	45
2.2. Метод Western-блот анализа	46
2.3. Определение активности ферментов антиоксидантной защиты – каталазы и СОД.....	46
2.4. Определение резистентности мембранных структур тканей к индукции свободнорадикального окисления <i>in vitro</i>	48
2.5. Представление данных	48
Глава 3. Результаты и их обсуждение	50
Влияние субхронического воздействия фторида натрия на компоненты редокс-сигнальной системы – динамика и органоспецифичность развития ответа.....	50
3.1. Влияние субхронического воздействия фторида натрия на компоненты редокс-сигнальной системы и активность ферментов основных метаболических путей в миокарде крыс.....	50
3.2. Влияние субхронического воздействия фторида натрия на компоненты редокс-сигнальной системы и активность ферментов основных метаболических путей в лёгких крыс.....	58
3.3. Влияние субхронического воздействия фторида натрия на компоненты редокс-сигнальной системы и активность ферментов основных метаболических путей в печени крыс.....	63
Заключение.....	71
Выводы.....	75
Список литературы	77

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АсАТ – аспаргатаминотрансфераза

АлАТ – аланинаминотрансфераза

АФК – активные формы кислорода

ГБДГ – гидроксibuтиратдегидрогеназа

γ-ГТ – γ-глутамилтрансфераза

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

ОДЕ – относительные денситометрические единицы

СОД – супероксиддисмутаза

ЩФ – щелочная фосфатаза

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

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

HSP (Heat Shock Proteins) – белки теплового шока

ВВЕДЕНИЕ

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 уровне отдельных органов, но и на внутриклеточные структуры и процессы. Так, хроническое действие фторида натрия повышает уровень активных форм кислорода (АФК) и активирует свободнорадикальные процессы (Конык У.В. с соавт., 2001; Гаврилюк Л.А. с соавт., 2007; Garcia-Montalvo E.A. et al., 2009).

В настоящее время показано, что АФК 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 АФК, 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 сигнальных каскадах клеток происходит активация редокс-чувствительных элементов, таких 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), индуцирующе синтез различных защитных белков.

Среди этих белков, в условиях субхронического воздействия фторида натрия, 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 (Heat Shock Proteins) (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.

Теоретическое и практическое значение работы: показано изменение уровней различных компонентов редокс-сигнальной системы (свободнорадикального окисления, фактора транскрипции HIF-1 α , белков семейства HSP и антиоксидантных ферментов) в динамике субхронического действия фторида натрия. На основе изучения изменения уровня фактора транскрипции HIF-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 HIF-1 α , конститутивных (HSC73, HOx-2) и индуцибельных (HSP72, HOx-1) белков семейства HSP и ферментов антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы и каталазы. Экспрессия внутриклеточных белков имеет органоспецифический характер и 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 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 HIF-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 ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2010; 2012); на международной научно-практической конференции «Науки о Земле, биоразнообразие 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 материалов и методов исследования, глав «Результаты исследований и их обсуждение», заключения, выводов и списка литературы, содержащего 85 отечественных и 170 иностранных источников. Иллюстративный материал представлен в 11 таблицах и на 11 рисунках.

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

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Роль свободнорадикальных процессов и антиоксидантной системы в метаболизме организма

Образование активных форм кислорода (АФК) происходит во многих метаболических процессах в клетках и является обязательным атрибутом нормальной аэробной жизни (Меньщикова Е.Б. с соавт., 2006). При этом наличие разветвлённой антиоксидантной защиты позволяет клеткам поддерживать концентрацию прооксидантов на безопасном для жизнедеятельности уровне. Кроме того, в процессе эволюции многоклеточные организмы научились использовать уникальные свойства АФК в качестве внутри- и межклеточных сигнальных молекул для регуляции иммунных процессов, работы кровеносной, эндокринной и других физиологических систем (Дубинина Е.Е., 2001; Турпаев К.Т., 2002; Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В., 2007; Зенков Н.К. с соавт., 2009).

1.1.1. Регуляторная роль АФК

Согласно современным представлениям все АФК можно разделить на 3 группы в зависимости от их происхождения и биологического действия (Владимиров Ю.А., 1998; Горожанская Э.Г., 2010):

– *первичные* – образуются при одноэлектронном окислении молекул с участием металлов переменной валентности. Эти радикалы функционируют в нормальных физиологических условиях и участвуют в различных биохимических процессах, выполняя жизненно важные функции. К ним относятся супероксидный анион (O_2^-) и перекись водорода (H_2O_2), участвующие в защите клетки от микроорганизмов, убихинон (коэнзим Q), участвующий в транспорте электронов в дыхательной цепи, оксид азота (NO) – многофункциональная молекула. Первичные радикалы в физиологических концентрациях не обладают мембранотоксичностью и не оказывают на организм патогенного действия. Более того, поскольку они участвуют в процессах жизнедеятельности здоровых клеток, их устранение может способствовать развитию негативных явлений, приводящих к нарушению нормальных физиологических функций организма.

– *вторичные* – образуются из первичных радикалов в результате развития неконтролируемых цепных реакций свободнорадикального окисления. К ним относятся гидроксильный радикал (OH^\bullet) и липидные радикалы, которые оказывают на организм цитотоксическое воздействие, что приводит к развитию различных патологий. Вторичные радикалы образуются при разложении H_2O_2 и липидных перекисей под действием Fe^{2+} (реакция Фентона).

– *третичные* – образуются при взаимодействии вторичных радикалов с молекулами антиоксидантов и других легко окисляющихся соединений. При этом радикал антиоксиданта, вступая в реакцию с гидроперекисями липидов, образует стабильные радикалы с малой реакционной способностью.

Существует принципиальная разница в функционировании первичных и вторичных радикалов в организме. Первичные радикалы специально вырабатываются клетками и участвуют в переносе электронов в дыхательной цепи (убихинон), защите от микроорганизмов (O_2^-) и регуляции кровяного давления (NO). Вторичные радикалы в основном оказывают цитотоксическое действие, вызывая повреждение нуклеиновых кислот, инактивацию ферментов и активацию свободнорадикальных процессов в мембранах клеток (Владимиров Ю.А., 1998).

Источники АФК могут быть как экзогенного, так и эндогенного происхождения. Обнаружен целый ряд специальных ферментов, основной функцией которых является генерация АФК (Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В., 2007; Губский Ю.И. с соавт., 2010; Еропкин М.Ю., 2010):

– в дыхательной цепи митохондрий НАДФ-зависимая дегидрогеназа и НАД-зависимая убихинонредуктаза генерируют O_2^- ;

– в процессе активации НАДФН-оксидазы фагоцитирующих клеток крови, эндотелиальных клеток, хондроцитов и астроцитов образуется O_2^- ;

– при синтезе простагландинов как по циклооксигеназному пути, так и липоксигеназному пути;

– в системе миелопероксидаза- H_2O_2 -галогены, которая запускается вследствие активации фагоцитоза и приводит к образованию O_2^- , OCl^- и OH^\bullet ;

- при спонтанном (O_2^-) или катализируемом (H_2O_2) моноаминооксидазами окислении дофамина и адреналина;
- в процессе синтеза NO в реакции дезаминирования аминокислоты L-аргинина до цитруллина при участии гем содержащих ферментов – NO-синтаз;
- при окислении антиоксидантов, например, глутатиона, аскорбиновой кислоты.

АФК в низких и средних концентрациях выполняют физиологические функции, играя важную роль в поддержании гомеостаза. Так, образующиеся в клетке АФК участвуют в катаболизме старых и синтезе новых молекул (Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В., 2007; Горожанская Э.Г., 2010). В процессе катаболизма разрушаются старые или повреждённые молекулы липидов и белков. С помощью стационарного уровня свободнорадикального окисления регулируется синтез лейкотриенов, тромбоксанов, простагландинов и стероидных гормонов. Большое значение АФК для организма заключается в обновлении мембран клеток и поддержании посредством этого структурного гомеостаза.

В клетках здорового организма стационарный уровень свободнорадикальных процессов является жизненно важным звеном в регуляции проницаемости и транспорта веществ через мембраны. Показано, что АФК влияют на процессы ионного транспорта путём химической модификации белковых компонентов ионных каналов – обратимо окисляют SH- и NH_2 -группы соответствующих белков (Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В., 2007).

У организмов различной степени организации АФК являются вторичными мессенджерами и вовлечены в целый ряд важнейших физиологических процессов внутриклеточного сигналинга, среди которых продукция инозитол-1,4,5-трифосфата, освобождение ионов кальция из внутриклеточных депо, активность фосфолипаз, фосфорилирование регуляторных белков, активация факторов транскрипции (Дубинина Е.Е., 2001; Турпаев К.Т., 2002; Зенков Н.К. с соавт., 2009; Лабас Ю.А. с соавт., 2010).

Одним из механизмов действия АФК на регуляторные белки и факторы транскрипции является обратимое окисление SH-содержащих аминокислотных

остатков цистеина или метионина в этих молекулах (Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В., 2007; Poole L.V. et al., 2004). В дальнейшем передача сигнала от АФК может осуществляться по трём редокс-чувствительным механизмам (Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В., 2007; Toone W.M. et al., 2001; Ikner A., Shiozaki K., 2005) (рис. 1): 1) через индукцию киназных каскадов, например MAPK (mitogen-activated protein kinase) и фосфорилирование белков; 2) через изменение работы нейтральных протеаз, которые модифицируют многие белки, ингибируя или активируя их за счёт частичного протеолиза или через изменение уровня ионов медиаторов, например, Ca^{2+} ; 3) через активацию факторов транскрипции, отвечающих на изменение окислительно-восстановительного баланса.

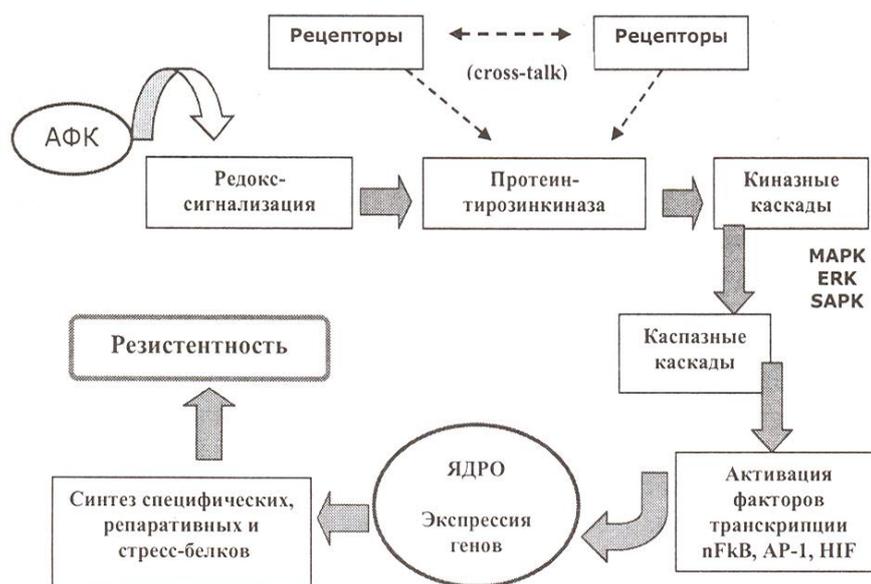


Рис. 1. Редокс-чувствительные механизмы передачи сигнала от АФК в клетке (по Т.Г. Сазонтовой с соавт., 2008)

Основная регуляторная система, контролирующая экспрессию генов в ответ на действие АФК, представлена в клетке ядерными факторами транскрипции Nrf2, NF- κ B, AP-1, NIF-1 α , NIF-3 α , Ref-1 и др. Роль факторов транскрипции заключается в том, что после активации они взаимодействуют с ДНК и инициируют синтез многочисленных защитных белков в клетке, среди которых антиоксидантные ферменты СОД, каталаза, гем-оксигеназа; белки семейства HSP, Fe^{2+} -связывающие белки (Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В., 2007). Повышение уровня

этих белков способствует адаптации и выживаемости клеток в неблагоприятных условиях. Кроме того, АФК активируют экспрессию генов сигнальных молекул – тирозингидроксилазы, эритропоэтина, онкопротеинов c-fos и c-jun и белков с репаративными функциями, предупреждающими повреждение генома клетки (Чумаков П.М., 2008).

Показано, что в редокс-зависимой передаче сигнала к ядру имеет значение равновесное соотношение в клетке прооксидантов и антиоксидантов (Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В., 2007; Сазонтова Т.Г. с соавт., 2008). Так, при повышении уровня АФК происходит индукция факторов транскрипции, что приводит в свою очередь к синтезу протекторных белков, среди которых ферменты антирадикальной защиты занимают существенное место. Вновь синтезированные белки ингибируют факторы транскрипции, и синтез белков прекращается. Такая сбалансированность про- и антиоксидантов в клетке приводит к тому, что после получения АФК-сигнала синтез антиоксидантов продолжается не до бесконечности, а только до уровня необходимого для компенсации свободнорадикального окисления (Сазонтова Т.Г. с соавт., 2008).

Таким образом, действие АФК пронизывает всю сложнейшую сигнальную и регуляторную систему клеток, что доказывает их жизненную необходимость в организме.

Основным патогенетическим фактором многих патологических состояний, сопровождающихся нарушением биологических барьеров клеточных мембран, является активация свободнорадикальных процессов, обусловленная избыточным уровнем АФК. Высокие уровни АФК вызывают в клетках биохимические и структурные нарушения, которые способствуют развитию функциональной несостоятельности различных органов и систем организма (Владимиров Ю.А., 1998; Величковский Б.Т., 2001; Кирьяков В.А. с соавт., 2004; Еропкин М.Ю., 2010).

Наряду с прямым повреждающим действием АФК на клеточные структуры и эндогенные макромолекулы, не менее важными являются последующие процессы, индуцируемые АФК (Дубинина Е.Е., 2001; Владимиров Ю.А., 2002; Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В., 2007). Так, активация свободнорадикального окисления

липидов приводит к повреждению мембранных структур клетки, в частности, нарушает целостность митохондрий и саркоплазматического ретикулума – основных внутриклеточных депо ионов Ca^{2+} . В результате этого увеличивается уровень Ca^{2+} в цитоплазме клетки. Высокие концентрации цитозольного Ca^{2+} активируют протеолитические ферменты и фосфолипазы, что приводит к разрушению клеточных структур. Накопление Ca^{2+} в митохондриях приводит к разобщению окислительного фосфорилирования, увеличению уровня восстановленных коферментов, что создаёт условия для дополнительной генерации АФК.

Кроме того, чрезмерное накопление АФК снижает антиоксидантную защиту клеток, что ведёт к дальнейшему повышению уровня свободнорадикальных реакций. Например, при ишемическом эпизоде без реперфузии активность каталазы в сердце снижается примерно на треть. При восстановлении уровня кислорода во время реперфузии активность каталазы снижается ещё больше, при этом степень ингибирования антиоксидантного фермента коррелирует с чрезмерной активацией свободнорадикальных реакций (Sazontova T.G. et al., 2002).

Таким образом, избыточный уровень АФК и чрезмерная активация свободнорадикальных процессов в организме связаны с целым комплексом внутриклеточных повреждений, ведущих к развитию различных патологических состояний.

1.1.2. Внутриклеточные защитные системы

Свободнорадикальное окисление непрерывно протекает во всех тканях организма. В условиях физиологической нормы оно находится на определённом стационарном уровне благодаря существованию многокомпонентной системы антирадикальной защиты, в которой можно выделить:

- редокс-регулируемые факторы транскрипции (Nrf2, NF- κ B, AP-1, HIF и др.);
- антиоксидантные ферменты (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионзависимые ферменты и др);
- низкомолекулярные антиоксиданты, синтезируемые в организме;

– естественные антиоксиданты, поступающие в организм с пищей (витамины С, Е, Р, флаваноиды, β -каротин и другие каротиноиды, предшественники группы витаминов А);

– специфические белки и пептиды, которые связывают ионы металлов с переменной валентностью (ферритин – в клетках, трансферрин и церулоплазмин – в плазме, карнозин – в мышцах и др.);

– специфические белки семейства HSP, быстрое накопление которых в клетках происходит при различных стрессорных состояниях.

Согласованная работа этих компонентов антирадикальной защиты поддерживает на постоянном уровне, как образование, так и превращение свободных радикалов в другие потенциально опасные соединения (Владимиров Ю.А. др., 1991; Владимиров Ю.А., 1998; Величковский Б.Т., 2001).

Редокс-регулируемые факторы транскрипции. В настоящее время выявлено несколько десятков редокс-регулируемых факторов транскрипции, отвечающих на изменение соотношения АФК и антиоксидантов в клетках. Так, фактор транскрипции HIF (Hypoxia Inducible Factor) контролирует экспрессию более 100 генов, поэтому опосредовано, через специфические и неспецифические белки, оказывает влияние на важнейшие функции организма. К ним относятся: поддержание гомеостаза железа через повышение уровня железо-связывающего и железо-переносящего белков; регуляция энергетического обмена, в частности, синтеза ферментов гликолиза, транспорта глюкозы; поддержание баланса антиоксидантной системы; активация или подавление апоптоза; индукция неоангиогенеза (Сазонтова Т.Г. с соавт., 2007; Жукова А.Г., 2012; Zhukova A.G., Sazontova T.G., 2005).

HIF представляет собой гетеродимерный редокс-чувствительный белок и состоит из двух субъединиц – HIF- α (120 kDa) и HIF- β (или ARNT – Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator, 91-94 kDa). Обе субъединицы имеют сайт ядерной локализации (NLS) и мотив «спираль-петля-спираль» (bHLH), характерный для многих факторов транскрипции и отвечающий за олигомеризацию. Ещё одним общим мотивом для α - и β -субъединиц является домен Per/ARNT/Sim (PAS-домен). Этот домен определяет принадлежность HIF к большому семейству

димерных эукариотических факторов транскрипции и отвечает за димеризацию, связывание с ДНК и взаимодействие с РНК-полимеразой. Кроме этих доменов в α -субъединице выделяют также два трансактивационных домена: N-terminal transactivation domain (N-TAD) и C-terminal transactivation domains (C-TAD). N-TAD необходим для генной специфичности, в то время как C-TAD способствует регуляции большинства HIF-зависимых генов (Dery M.A. et al., 2005; Zhukova A.G., Sazontova T.G., 2005).

Субъединица HIF- β является конститутивным ядерным белком, уровень которого не зависит от концентрации кислорода в клетке (Gu Y. Z. et al., 2000). Субъединица HIF- α является индуцибельной, кислородчувствительной и выполняет важную роль в адаптации организма к недостатку кислорода. Выделяют 3 её изоформы, которые обладают различными биологическими свойствами – HIF-1 α , HIF-2 α и HIF-3 α . Основные различия между этими молекулами заключены в N-TAD участке, точнее в домене O₂-зависимой деградации (ODD). Кроме этого, субъединица HIF-3 α не имеет C-TAD на C-конце, что делает её слабым транскрипционным фактором по сравнению с HIF-1 α и HIF-2 α .

HIF-1 α и HIF-2 α имеют очень близкие биохимические свойства, но каждая субъединица контролирует свои определённые биологические функции. Например, в процессе эмбриогенеза HIF-1 α контролирует процесс образования сосудов, а HIF-2 α – продукцию катехоламинов (Fedele A.O. et al., 2002; Wenger R. H., 2002). Изоформа HIF-1 α отвечает за экспрессию генов, участвующих в регуляции углеводного обмена (в частности, в регуляции гликолиза), антиоксидантной системы, тогда как HIF-2 α регулирует синтез эритропоэтина в печени и основного транспортёра железа (divalent metal transporter 1 – DMT1) в тонком кишечнике.

В целом гены, регулируемые изоформами субъединицы HIF- α , можно разделить на 3 группы: 1) специфически регулируемые HIF-1 α (например, гены ферментов гликолиза и антиоксидантные ферменты); 2) специфически регулируемые HIF-2 α (например, гены фактора роста TGF- α и эритропоэтина); 3) регулируемые двумя изоформами HIF-1 α и HIF-2 α (например, гены фактора роста VEGF и транспортёра глюкозы – GLUT1) (Жукова А.Г., 2012).

Транскрипция и трансляция HIF-1 α в клетках идут постоянно с затратой большого количества энергии. Однако в условиях нормоксии время полужизни этого фактора транскрипции составляет менее 5 мин.

В настоящее время описано несколько механизмов регуляции уровня HIF-1 в клетках. Так, стабилизация и активация HIF-1 α регулируется его посттрансляционной модификацией, включающей гидроксирование, ацетилирование, убиквитинирование и фосфорилирование (Ke Q., Costa M., 2006).

В физиологических условиях содержание HIF-1 α в клетке минимально, за счёт его протеасомной деградации. Важными регуляторами этого процесса являются белок vonHippel-Lindau (pVHL) и ферменты пролил-гидроксилазы (Zhukova A.G., Sazontova T.G., 2005). Показано, что высокая активность пролил-гидроксилаз зависит от уровня кислорода, Fe²⁺, pH среды и косубстратов реакций пролил-гидроксилирования – α -кетоглутарата и аспартата. α -Кетоглутарат синтезируется в реакциях цикла Кребса, а окисляется в реакциях субстратного фосфорилирования и в НАД⁺-зависимых реакциях, катализируемых митохондриальным дыхательным комплексом I. Вовлечение α -кетоглутарата в пролил-гидроксилазные реакции сопряжено с образованием в цитозоле сукцината – ингибитора этих реакций, что необходимо, по-видимому, для притормаживания активности пролил-гидроксилаз, и может быть причиной небольшого фонового содержания HIF в условиях нормоксии (Лукьянова Л.Д., 2008). Последнее необходимо для индукции базового содержания генов, ответственных за синтез энергии.

При снижении уровня кислорода происходит ингибирование пролил-гидроксилаз и подавление протеасомной деградации HIF- α , что приводит к его стабилизации и транслокации в ядро. После этого HIF- α в ядре связывается с субъединицей HIF-1 β и с коактиватором транскрипции CBP/p300. CBP/p300 связывается с α - и β -субъединицами по C-TAD и рекрутирует дополнительные коактиваторы транскрипции – TIF2 (transcription intermediary factor-2), SRC-1 (steroid receptor coactivator-1) или Ref-1 (redox factor-1). Кроме того, при длительной гипоксии происходит фосфорилирование HIF- α с помощью MAPK или PI3K (Zhong H. et al., 2000), что также приводит к повышению его транскрипционной активности.

При этом показано, что в условиях гипоксии этот путь активации HIF- α усиливается АФК (Bilton R.L., Booker G.W., 2003).

Недавними исследованиями показано участие белков семейства HSP в стабилизации HIF при нормоксии и гипоксических состояниях (Тихонова Н.С. с соавт., 2008; Katschinski D. M. et al., 2004). Так, белок HSP90 связывается с доменом PAS в HIF-1 β , тогда как HSP70 узнаёт в субъединице HIF-1 α домен кислородзависимой деградации. В результате этих межбелковых взаимодействий происходит стабилизация фактора HIF-1 α в физиологических условиях. В тоже время, белок HSP70 увеличивает время жизни HIF-1 α в клетках, подвергнутых гипоксическому воздействию.

Важную роль в стабилизации HIF-1 α играет уровень АФК в клетке (Yang Z.-Z. et al., 2003; Zhang G.X. et al., 2007; Patten D.A. et al., 2010). Субъединица HIF-1 α содержит негемовое железо (два атома Fe(II) на одну молекулу белка) и активный остаток цистеина, которые образуют железосерный кластер, выполняющий функцию рецептора АФК (Srinivas V. et al., 1998). При гипоксии, в частности в митохондриях увеличивается уровень АФК, под действием которых происходит окисление и диссоциация связанных с HIF-1 α ионов железа (Schroedl C. et al., 2002; Noppeler H. et al., 2003). Эта модификация подавляет протеасомную деградацию HIF-1 α и делает возможным связывание её с субъединицей HIF-1 β и транслокацию в ядро. Процессы окисления в митохондриях не только регулируют уровень HIF-1 в клетке, но и сами являются мишенью для воздействия этого фактора (Анохина Е.Б., Буравкова Л.Б., 2010). Показано, что HIF-1 повышает экспрессию киназы, ингибирующей пируватдегидрогеназу, что препятствует включению пирувата в цикл Кребса. В результате снижается потребление кислорода митохондриями и образование АФК при гипоксии.

В стабилизации HIF-1 α в условиях гипоксии участвуют также АФК, образованные NADPH-оксидазой эпителиальных клеток. Эти АФК стабилизируют HIF-1 α через Ca²⁺-зависимый сигнальный путь, активирующий фосфолипазу C γ (PLC) и протеинкиназу C (PKC) (Yuan G. et al., 2008).

После активации и стабилизации транскрипционный фактор HIF-1 способен связываться с гипоксия-чувствительным элементом (HRE) в регуляторной области HIF-зависимых генов, экспрессия которых необходима для регуляции метаболизма, ангиогенеза, пролиферации и выживания клеток в условиях гипоксического воздействия.

Существует органная специфичность индукции HIF-1. При нормоксии HIF-1 α обнаружен в мозге, почках, печени, сердце и скелетных мышцах, при этом его исходный уровень в этих органах практически одинаков (Сазонтова Т.Г. с соавт., 2007; Stroka D.M. et al., 2001). При гипоксических состояниях HIF-1 α в разных органах экспрессируется не одинаково. Так, в сердце увеличение уровня HIF-1 α в 2 раза зарегистрировано через 3 часа после острой гипоксии (8% O₂, 2 часа), тогда как в печени только через 6 часов, причём в гораздо меньшей степени, чем в сердце – на 50%. Незначительная индукция HIF-1 α в мозге зарегистрирована лишь через 12 часов после острой гипоксии. При этом повышение уровня HIF-1 α в этих органах сопровождалось активацией синтеза защитных белков – индукцибельной гем-оксигеназы (HOx-1), молекулярного шаперона HSP70 и антиоксидантных ферментов (Сазонтова Т.Г. с соавт., 2007; Zhukova A.G., Sazontova T.G., 2005).

Ферменты антиоксидантной защиты. К основным защитным механизмам относятся ферменты антиоксидантной защиты, уровень которых в клетке поддерживается за счёт постоянного синтеза (Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В., 2007; Горожанская Е.Г., 2010). К ним относятся супероксиддисмутаза (СОД), катализирующая реакцию дисмутации O₂⁻ в H₂O₂, каталаза, разлагающая перекись водорода, глутатионзависимые пероксидазы и трансферазы, удаляющие органические перекиси. Антиоксидантные ферменты могут находиться в связанном состоянии с мембранами или же в свободном виде в цитозоле, а кроме того содержаться в клеточных органеллах, например, в митохондриях, и даже иметь своеобразное депо в клетке, находясь в большом количестве в пероксисомах. Такой запас необходим на первых этапах срочного ответа организма на окислительный стресс, до стадии синтеза новых молекул ферментов (Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В., 2007).

Супероксиддисмутаза – индуцируется при повышении концентрации супероксидных радикалов и, таким образом, находится «у самых истоков» образования АФК (Fridovich I., 1995). Этот фермент катализирует реакцию дисмутации, то есть взаимодействия двух O_2^- друг с другом, превращая токсичный радикал в менее токсичную H_2O_2 и кислород. В организме человека и животных выделяют 3 изоформы фермента: цитозольную – содержит медь и цинк (Cu,Zn-СОД), митохондриальную – содержит марганец (Mn-СОД) и внеклеточную (экстрацеллюлярную) высокомолекулярную форму – Э-СОД (Cu,Zn-СОД). В присутствии высоких концентраций H_2O_2 СОД может образовывать высокореакционный гидроксильный радикал (Fridovich I., 1999). Этот радикал нарушает структуру СОД, что приводит к нарушению потере активности фермента. Для эффективной работы СОД необходимы наличие низкомолекулярных антиоксидантов, либо согласованная работа с пероксидазами.

Одним из главных ферментов, связанных с метаболизмом H_2O_2 , является **каталаза**. Каталаза представляет собой гемопротейн, содержащий четыре гемовые группы и обладающий двойной функцией – каталазной и пероксидазной (Sando T. et al., 1984; Eriksson A. M. et al., 1992). При высоких концентрациях H_2O_2 в клетке преобладает каталазная активность фермента, а при низких – пероксидазный путь расщепления H_2O_2 . У человека и животных максимальная активность каталазы выявлена в эритроцитах, печени и почках тогда, как низкая активность этого фермента – в сердце и особенно в мозге. В клетках каталаза локализована преимущественно в пероксисомах, однако низкий её уровень обнаруживают в цитозоле и в митохондриях (Sando T. et al., 1984; Radi R. et al., 1991; Eriksson A. M. et al., 1992).

Устойчивость клеток к действию H_2O_2 определяется активностью не только каталазы, но и **глутатионпероксидазной ферментативной системой**. В то время как каталаза наиболее активна при высоких концентрациях перекиси, действие глутатионпероксидазы наиболее эффективно проявляется при малых количествах субстрата. Глутатионпероксидаза локализована в цитозоле и матриксе митохондрий. Помимо H_2O_2 , она способна восстанавливать гидроперекиси жир-

ных кислот, а также перекиси белкового или нуклеинового происхождения (Кулинский В.И., 1999). Лимитирующей стадией последнего процесса в клетках является концентрация глутатиона, снижение которой, как правило, сопровождается активацией свободнорадикального окисления липидов (Владимиров Ю.А., 1998).

Кроме глутатионпероксидазы, в цитозоле клеток млекопитающих выявлены многофункциональные белки – *глутатионтрансферазы*, основной функцией которых является защита клеток от ксенобиотиков и продуктов перекисного окисления липидов посредством их восстановления (Кулинский В.И., Колесниченко Л.С., 1990; Кулинский В.И., 1999).

Антиоксидантная система клетки включает большое количество **низкомолекулярных компонентов**, активных в водной и липидной фазах. В её состав входят фенольные антиоксиданты, серосодержащие соединения, каротиноиды и витамины А, С и Е. Кроме того, в сыворотке крови в роли антиоксидантов могут выступать альбумин, церулоплазмин, билирубин, трансферрин (Владимиров Ю.А., 1998; Клебанов Г.И. с соавт., 1999).

Специфические белки семейства HSP. Помимо активации антиоксидантных ферментов АФК индуцируют синтез защитных белков семейства HSP. При этом увеличение уровня HSP имеет триггерное влияние на защитную систему клетки: активация синтеза этих белков необходима для подготовки клеток к длительным повреждающим воздействиям (Андреева Л.И. с соавт., 2009; Еропкин М.Ю., 2010; Титов В.Н., Крылин В.В., 2010). Существует несколько классов HSP, которые обозначают в соответствии с величиной молекулярной массы их представителей: HSP100, 90, 70, 60 и малые HSP.

Защитные свойства HSP определяются их шаперонной функцией – способностью связываться с денатурированными в той или иной мере белками и пептидами, а также с вновь синтезированными белками и придавать им правильную функциональную конформацию. Это свойство HSP является важнейшим для функционирования живых систем в нормальных условиях, а также при неблагоприятных воздействиях и адаптации к ним. Из шаперонных свойств HSP вытекает их третья важная функция – это способность связывать белки и регулировать их

активность. Так, мишенями для HSP являются белки, имеющие отношение к клеточному сигналингу и транскрипции генов – факторы транскрипции NF- κ B, NIF-1, белки, участвующие в инициации процесса апоптоза (Тихонова Н.С. с соавт., 2008; Gushova I.V., Margulis B.A., 2006).

Наиболее исследованное семейство белков теплового шока – семейство HSP70 – включает в себя индуцируемый стрессовыми воздействиями Hsp72 и конститутивно экспрессируемый клетками белок Hsp73 (или Hsc70 – heat shock cognate protein 70).

Hsc70 представляет собой белок с выраженной структурной консервативностью. Этот белок постоянно экспрессируется в клетках в отсутствие стресса, выполняет функцию молекулярного шаперона для вновь синтезируемых белков, участвует в их транспорте в клеточные органеллы, а также переносит необратимо повреждённые полипептиды и белки к протеасомам для последующей их деградации. Показано, что белок Hsc70 необходим для адаптационных изменений в клетках и повышения устойчивости к действию повреждающего фактора (Андреева Л.И. с соавт., 2009).

Индукцибельный белок, Hsp72, отличает мощная экспрессия в ответ на стрессирующие воздействия самой разной природы. Поэтому основным предназначением Hsp72 является выполнение защитной функции по отношению к клеточным белкам при стрессе, а сам Hsp72 относят к одному из основных маркёров цитотоксических и патогенных воздействий на организм животных и человека. Так, синтез индуцибельного Hsp72 запускается гипертермией, окислительным стрессом (Сазонтова Т.Г. с соавт., 2005), тяжёлыми металлами (Efremova S.M. et al., 2002), органическими растворителями (Mizushima Y. et al., 1993), радиацией (Ibuki Y. et al., 1998) и др. факторами. При этом накопление Hsp72 происходит тканеспецифично и зависит от продолжительности и силы воздействия повреждающего фактора. Например, его содержание очень высоко в сердце и печени, и крайне низко (и не запускается в ответ на стресс) в головном мозге и лёгких (Гужова И.В., 2004; Сазонтова Т.Г. с соавт., 2007). Кроме того, данный белок характеризует лабильная динамика его экспрессии – срочное реагирование на повре-

ждающее воздействие и такое же быстрое снижение экспрессии в случае возвращения клетки в нормальное состояние.

Показана связь активации свободнорадикальных процессов и экспрессии Hsp72 (Сазонтова Т.Г. с соавт., 2007; Хоменко И.П. с соавт., 2007; Shinkai M., 2004). При этом происходит улучшение окислительно-восстановительного состояния клетки и увеличение активности антиоксидантных ферментов (каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы).

В настоящее время в литературе имеются данные о выходе белков HSP из клетки во внеклеточное пространство, а также в биологические жидкости – слюну или кровь человека и животных (Евдонин А.Л., Медведева, 2009; Титов В.Н., Крылин В.В., 2010). Так, выход Hsp72 наблюдается при тепловом шоке, ионизирующем облучении (Gehrmann M. et al., 2005), гипертонии и атеросклерозе (Rockley A.G. et al., 2002; 2003), отёке лёгких (Ganter M. et al., 2006), вирусных инфекциях (Barreto A. et al., 2003; Kimura F. et al., 2004), психическом и физическом стрессах (Fleshner M. et al., 2003, 2004; Melling C.W. et al., 2007). Кроме того, показано, что белки HSP способны выходить и из неповреждённых клеток.

В качестве одного из транспортёров HSP из клетки рассматривают экзосомы – внутренние везикулы мультивезикулярных тел, которые выходят во внеклеточную среду путём слияния с клеточной поверхностью (Евдонин А.Л., Медведева, 2009). Выход HSP70 из клеток в составе экзосом подтверждён следующими фактами: 1) Hsp72 был обнаружен в составе экзосом, изолированных из клеток крови, миобластов и фибробластов (Lancaster G.I., Febbraio M.A., 2005) и 2) Hsp72 колокализовался с маркером экзосом Rab4 (Gastpar R. et al., 2005).

Выброс HSP70 из клеток осуществляют секреторные лизосомы, при этом выход белка сопровождается появлением на поверхности клеток маркера лизосом Lamp1 (Mambula S.S., Calderwood S.K., 2006). Кроме того, выход HSP70 может происходить через плазматическую мембрану клетки и не в составе везикул. Так, HSP70 взаимодействует с фосфатидилсерином, в результате чего он транспортируется на наружный липидный слой плазматической мембраны. При этом HSP70

ассоциируется с кислыми липидами при помощи своего АТФазного и липидсвязывающего домена (Arispe N. et al., 2004; Harada Y. E t al., 2007).

Внеклеточный HSP70 обладает множественными функциями, основными из которых являются иммуномодуляторная и сигнальная.

Так, HSP70 распознаётся иммунной системой как сигнал опасности, участвует в активации и пролиферации естественных киллерных клеток, стимулирует синтез и секрецию провоспалительных цитокинов (Multhoff G. et al., 1999; Asea A. et al., 2000; Campisi J. et al., 2003).

Внеклеточный HSP70 специфически связывается с поверхностной мембраной различных клеток иммунной системы (Asea A. et al., 2000; 2002; Gross et al., 2003), эндотелиальных и эпителиальных клеток (Theriault et al., 2005).

В настоящее время обнаружена группа клеточных рецепторов, с которыми связывается внеклеточный HSP70. Так показано, что он активирует toll-like рецепторы (TLR), узнающие структурные компоненты различных бактерий, вирусов и грибов (Sumbayev V.V., Yasinska I.M., 2006; Evdonin A.A. et al., 2006). При этом происходит активация транскрипционного фактора NF- κ B и MAP-киназ (Vabulas R.M. et al., 2002). Помимо TLR HSP70 способен связываться и со скэвенджер-рецепторами, которые способны узнавать химически модифицированные формы липопротеинов, в частности, окисленные или ацетилированные липопротеины низкой плотности (Murphy J.E. et al., 2005; Adachi H. et al., 2006). Связывание этих рецепторов с лигандом ведёт к активации транскрипционного фактора NF- κ B (Li D., Mehta J.L., 2000) и повышению внутриклеточного уровня АФК (Li D. et al., 2003).

Таким образом, белки семейства HSP являются регуляторами многих процессов, связанных с устойчивостью клеток и организма в целом к неблагоприятным воздействиям, в том числе к окислительному стрессу.

Активация свободнорадикального окисления может приводить также к индукции низкомолекулярных белков семейства HSP, в частности гем-оксигеназы (НОх). НОх обладает разными функциями, в том числе регуляторными, но первоочередной является контроль уровня гема в клетке (Maines M.D., 2000). Благодаря

этому, в тканях всегда присутствует определённый уровень конститутивной формы – НОх-2, а при дополнительных нагрузках, связанных с повышенной продукцией АФК синтезируется индуцибельная форма этого белка – НОх-1.

Известны три изоформы гем-оксигеназ: индуцибельная форма – НОх-1 и две конститутивные формы – НОх-2 и НОх-3 (Maines M.D. et al., 1986; Maines M.D., 1988; McCoubrey W.K. et al., 1997).

Все ткани млекопитающих содержат в себе различные уровни базальной активности НОх. Так, например, Scaragnini G. с соавт. (2002) показали, что в мозге присутствуют три изоформы НОх, которые распределены не равномерно: НОх-2 > НОх-1 > НОх-3. Высокий уровень НОх-1 и НОх-2 обнаружен в мозжечке и гиппокампе. НОх-3 была обнаружена в гиппокампе, мозжечке и коре мозга. В печени обнаружены две изоформы белка НОх-1 и НОх-2 (Bauer M., Bauer I., 2002). НОх-2 в норме преобладает в эндотелиальных и гладкомышечных клетках сосудов, каротидных тельцах (Ewing J.F. et al., 1994; Zachary R. et al., 1996). Предполагается, что внутриклеточный «свободный» гем должен подвергаться разложению НОх непосредственно в той ткани, в которой и образовался, это предпочтительней, чем экспортирование в сыворотку и последующее разложение в печени (Ryter S.W., Tyrrell R.M., 2000). Высокий уровень гем-оксигеназной активности обнаружен в печени, почках, селезёнке, семенниках, а также в мозге и лёгких (Maines M.D., 1988; Dennerly P.A. et al., 1993; Rodgers P.A. et al., 1995).

В разных тканях активность НОх сопряжена с работой других ферментов. Например, в почках повышение активности НОх-1 индуцирует синтез эритропоэтина, а в гладкомышечных клетках NO-синтазы индуцируют НОх-1 (Mottetlini R. et al., 2000). Активность НОх-1 в головном мозге крыс сопряжена с работой важного антиоксидантного фермента – Mn-супероксиддисмутазой (Mn-СОД) (Colombrita C. et al., 2003) При этом гены для НОх-1 и Mn-СОД имеют разный уровень экспрессии в мозге – Mn-СОД > НОх-1. Высокий уровень НОх-1 и Mn-СОД обнаружен в гиппокампе, мозжечке и коре головного мозга. В сердце НОх-1 помимо цитозоля локализована и в саркоплазматическом ретикулуме, при этом

НОх-1 участвует в регуляции Ca^{2+} -гомеостаза в миокарде (Cornelussen R.N.M., Knowlton A.A., 2002).

Транскрипция гена НОх-1 регулируется интенсивностью свободнорадикального окисления и индуцируется прооксидантными факторами. Кроме того, АФК-опосредованная индукция гена НОх-1 увеличивается и при снижении уровня антиоксидантов в клетке, например, восстановленного глутатиона, глутатионпероксидазы (Calabrese V. et al., 1998; Zhukova A.G., Sazontova T.G., 2004).

Действие повреждающих факторов на организм сопровождается экспрессией индуцибельной формы гем-оксигеназы – НОх-1. При этом синтез этого белка имеет тканеспецифичный характер (Zhukova A.G., Sazontova T.G., 2004). Так, показаны отличия в базальном уровне НОх-1 и скорости индукции этого белка в ответ на острую гипоксию (8% O_2 , 2ч) в печени, лёгких, сердце и коре мозга (Сазонтова Т.Г. с соавт., 2007). Исходный уровень НОх-1 в печени контрольных животных значительно – в 1,5-2 раза выше, чем в лёгких, сердце и мозге. Однако в ответ на острую гипоксию синтез НОх-1 в печени активируется медленно, а в лёгких, сердце и мозге выявлена быстрая реакция на повреждающее воздействие. При этом увеличение уровня НОх-1 происходило одновременно с индукцией белка HSP72.

Показано, что увеличение уровня НОх-1 важно для регуляции гомеостаза железа, утилизации «свободного» гема и тем самым, снижения чрезмерной активации свободнорадикальных процессов. На примере НОх-1 ярко проявляется дуализм регуляции гомеостаза. Так, активация НОх-2 приводит к высвобождению АФК-индуцирующих факторов, но одновременно запускает ряд механизмов, ограничивающих свободнорадикальное окисление. К наиболее важным из них относятся образование билирубина, обладающего антиоксидантными свойствами и индукция синтеза Fe-связывающих белков (Zhukova A.G., Sazontova T.G., 2004). Увеличение уровня НОх-2 свидетельствует об углублении тканевой гипоксии и компенсаторной реакции тканей к ней. Благодаря наличию O_2 -чувствительного домена и гем-регуляторного участка НОх-2 может функционировать как гем/кислородный сенсор и участвовать в регуляции экспрессии генов, которые

индуцируются АФК, гемом или Fe, например, генов ферритина, iNO-синтазы и HOx-1 (Maines M.D., 1997).

Таким образом, активация HOx является важным компонентом редокс-сигнальной системы. Хотя обе изоформы HOx катализируют одну реакцию, HOx-1 и HOx-2 могут функционировать по-разному. HOx-1 – это стресс-индуцированная форма, которая быстро активируется АФК и гипоксическими состояниями. Высокая индукция HOx-1 защищает клетки при различных патологических состояниях от чрезмерной активации свободнорадикальных реакций. HOx-2 является конститутивной формой и помимо поддержания клеточного гомеостаза гема участвует в инактивации избыточных NO и АФК.

Важное условие эффективного защитного действия антиоксидантной системы заключается в синхронном взаимодействии всех её компонентов, а также лабильной адаптации системы в зависимости от типа повреждающего воздействия и уровня свободных радикалов в клетке. Увеличение активности антиоксидантной системы всегда связано с ростом концентрации субстратов для компонентов этой системы – АФК. Именно они являются сигналом к увеличению синтеза новых молекул антиоксидантов. Главным при этом является дозированность окислительного стресса, то есть необходимость, с одной стороны, активировать защитные системы, а с другой – не сорвать адаптационный процесс и не вызвать истощения клеточных ресурсов, и возможного повреждения (Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В., 2007).

1.2. Механизмы физиологического и токсического действия соединений фтора на организм

Фтор широко распространён в природе и является производственным загрязнителем (Мусийчук Ю.И. и соавт., 2012). В свободном состоянии фтор в природе не существует, однако образует неорганические и органические комплексные соединения – фториды, содержание которых в Земной коре составляет примерно 0,06-0,09% (Шалина Т.И., Васильева Л.С., 2009; Barbier O. et al., 2010). Так, фторид натрия в природе встречается в виде минерала виллиомита, а также входит в состав криолита (Мусийчук Ю.И. и соавт., 2012).

Известно, что низкие концентрации фтора необходимы для нормального роста и развития организма. Так, фтор оказывает регуляторное влияние не только на клетки костной ткани (остеобласты и остеокласты), но и на клетки эндотелия, печени, почек, миокарда и нервной системы (Cicek E. et al., 2005; Chouhan S. et al., 2009; Barbier O. et al., 2010).

Суточная потребность во фторе составляет 1,5-4 мг. Токсические дозы фтора для человека варьируют в широком диапазоне: для взрослых – 16-64 мг/кг, а для детей 3-16 мг/кг (Шалина Т.И., Васильева Л.С., 2009; Barbier O. et al., 2010). Токсичность фтора связана с его высокой химической и биологической активностью.

Суточное поступление фторидов с пищей составляет в среднем до 2-3 мг, 90-97% которого абсорбируется через желудочно-кишечный тракт в кровь. Из плазмы крови фтор быстро распределяется во внутриклеточных и внеклеточных жидкостях, тканях и органах (Whitford G.M., 1994). Фтор способен быстро проникать через биологические мембраны в форме HF путём пассивной диффузии. Эксперименты с радиоактивным фтором показали, что его внутриклеточная концентрация зависит от градиента рН и на 10-50% ниже, чем в плазме крови. Равновесные концентрации фтора достигаются быстрее между плазмой и хорошо снабжаемыми кровью органами (сердце, лёгкие и печень), чем между плазмой и скелетными мышцами, кожей и другими органами (Агалакова Н.И., Гусев Г.П., 2011). В результате соединения фтора в организме распределяются следующим образом – костная ткань > эмаль зубов > дентин > паренхиматозные органы (Калетина Н.И., 2009; Whitford G.M., 1994). Фтор, как химический элемент не подвергается метаболическим превращениям, а может либо накапливаться, либо только выводиться из организма. При этом максимальное его накопление показано в почках, меньшее в головном мозге и отсутствие в печени (Adamek E. et al., 2005). Выведение фтора из организма происходит через кожные покровы, пищеварительный тракт и мочевыделительную систему. Период полувыведения фтора из организма составляет от 2 до 9 часов (Калетина Н.И., 2009).

В тканях животных существуют разные формы неорганического фтора:

1) фтор в виде свободных ионов, который может быть измерен с помощью ионоселективных электродов;

2) фтор в виде соединений и комплексов, включая металлоорганические, такие как:

а) HF при низких значениях pH,

б) комплексы фтора, связанного с ионами металлов (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} и др.),

в) фтор, абсорбированных в минералоорганических осадках, например, в слюне,

г) фтор, инкорпорированный в апатитные элементы костей и зубов. Все эти неорганические фракции фтора могут быть превращены в ионный неорганический фтор, и их содержание может быть измерено (Venkateswarlu P., 1994).

Избыточное поступление соединений фтора в организм приводит к развитию хронической фтористой интоксикации – флюороза. Различают эндемический, профессиональный (производственный), «соседский» и ятрогенный флюороз (Авцын А.П., Жаворонков А.А., 1981). Эндемический флюороз вызывается высоким содержанием фтора в водоемных источниках (более 1,5 – 2 мг/л) (Казарина Л.Н. и др., 2015; Шалина Т.И., Васильева Л.С., 2009). Профессиональный флюороз возникает при производственном контакте с соединениями фтора и в частности, со фторидом натрия. Характерен для рабочих электролизных цехов алюминиевых заводов и работников, задействованных на производстве суперфосфата и криолита (Измеров Н.Ф. и др., 2012). Под «соседским» флюорозом понимают заболевание населения, не принимающего непосредственного участия в производстве. Так у лиц, проживающих около алюминиевого завода более 5 лет, но никогда не работающих на нём, отмечается высокий уровень содержания фтора в волосах и ногтях, высокий уровень флюороза (Ji Hai-lian, Xiang Zhen, 2002). Форма флюороза, возникающая при использовании фтора в лечебных и профилактических целях, получила название ятрогенного флюороза.

Элективность поражения соединениями фтора высокоминерализованных тканей, в частности костей скелета и зубов, хорошо известна (Авцын А.П., Жаворонков А.А., 1981; Агалакова Н.И., Гусев Г.П., 2011). Однако флюороз относится

к полисистемным заболеваниям, при котором наблюдаются патологические изменения во многих органах. При флюорозе поражаются печень, почки, зубы, нейроэндокринная, сердечнососудистая и костная системы (Шалина Т.И., Васильева Л.С., 2009).

В настоящее время вопрос о биогенном влиянии фтора на клеточном уровне остаётся открытым, поскольку необходимое его количество находится близко к дозе, вызывающей повреждающее действие. Показано, что эффекты фтора на физиологические функции организма и клеточный метаболизм зависят от типа клеток, концентрации и времени действия (Barbier O. et al., 2010). Так, например, в костной и зубной тканях фтор в микромолярных концентрациях вызывает клеточную пролиферацию и рост, тогда как в миллимолярных – подавляет пролиферацию и индуцирует апоптоз клеток (Yan X. et al., 2009; Yang S. et al., 2011).

Выделяют несколько механизмов действия неорганических соединений фтора на организм человека и животных (рис. 2).

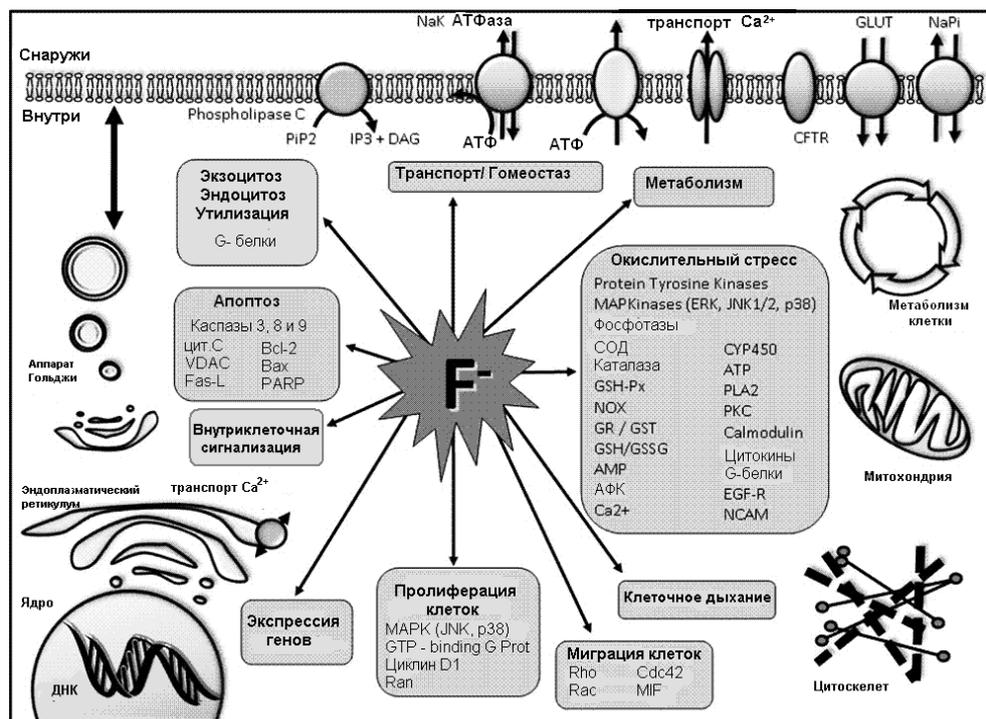


Рис. 2. Молекулярные механизмы физиологического и токсического действия фтора на клетки млекопитающих (по O. Barbier et al., 2010)

Так, соединения фтора влияют на:

1) метаболизм клеток;

- 2) проницаемость клеточных мембран;
- 3) редокс-статус клеток и процессы транскрипции и трансляции;
- 4) различные пути внутриклеточной сигнализации;
- 5) механизмы пролиферации и пути программируемой гибели клеток (апоптоз и некроз).

Гормональные и метаболические нарушения при интоксикации фторидами. Универсальным способом, обеспечивающим сохранение гомеостаза при действии неблагоприятных факторов, является развитие стресс-реакции, которое опосредовано изменением уровня гормонов ГГНС (Пшенникова М.Г., 2001). При этом степень развития стресс-реакции может зависеть как от активности индуктора стресса, так и от состояния регуляторных и защитных систем организма. Однако активность ГГНС при флюорозе изучена мало. Имеются морфологические исследования, свидетельствующие о согласованных изменениях в гипоталамо-нейросекреторной системе, аденогипофизе и коре надпочечников при интоксикации фтором. Так, показано снижение морфофункциональной активности коры надпочечников и аденогипофиза (Авцын А.П., Жаворонков А.А., 1981), что может проявляться угнетением секреции гормонов ГГНС. Результатом такой гормональной перестройки является развитие метаболической недостаточности в тканях.

Важную роль в развитии неспецифической стресс-реакции при интоксикации фтором играют паратиреоидный гормон (ПТГ), кальцитонин и тиреоидные гормоны. Показано, что при фтористой интоксикации повышается функциональная активность основных клеток парашитовидных желёз и С-клеток щитовидной железы (Токарь В.И. с соавт., 1991; Уланова Е.В. с соавт., 2006; Khandare A.L. et al., 2005). В результате этого повышается уровень гормонов, регулирующих гомеостаз Ca^{2+} в организме – ПТГ и кальцитонина. При этом секреция ПТГ в ответ на фтористую интоксикацию была избыточной – уровень этого гормона в крови экспериментальных крыс превышал контрольные значения в 5 раз (Уланова Е.В. с соавт., 2006). В настоящее время показано, что высокие уровни ПТГ увеличивая ток Ca^{2+} в клетки способствуют разобщению окислительного фосфорилирования, уменьшению образования АТФ, оказывают неблагоприятное влияние на липид-

ный и углеводный обмен (Волгина Г.В., Перепеченных Ю.В., 2000; Aftab M. et al., 2003; Koroglu B.K. et al., 2010).

Длительное действие фтора приводит к изменению содержания в крови тиреотропного гормона (ТТГ) и гормонов щитовидной железы – трийодтиронина (T_3) и тироксина (T_4). При этом динамика уровня этих гормонов зависит от продолжительности действия повреждающего фактора. Первая фаза характеризуется повышением в крови уровня как ТТГ, так и T_4 , на фоне сниженного содержания T_3 . Затем уровень ТТГ и гормонов щитовидной железы возвращается к контрольным значениям, а по мере продолжительности действия повреждающего фактора наступает фаза угнетения, характеризующаяся снижением уровня ТТГ, T_4 и T_3 (Токарь В.И. с соавт., 1991; Шалина Т.И., Васильева Л.С., 2009; Wang H. et al., 2009). Гормоны щитовидной железы регулируют окислительно-восстановительные процессы и основной обмен, в результате чего обеспечивают более интенсивное функционирование всего организма в условиях действия стрессорного фактора.

Таким образом, при фтористой интоксикации наблюдаются разнонаправленные изменения в содержании важных адаптивных гормонов в крови – гормонов ГГНС, ТТГ, T_3 , T_4 , ПТГ, кальцитонина и др. При этом фазовые изменения в содержании этих гормонов отражают компенсаторную реакцию организма в ответ на действие стрессорных факторов окружающей среды. В частности, может изменяться активность ферментов, ответственных за поддержание метаболизма в организме на физиологическом уровне.

Показано, что соединения фтора обладают высоким сродством к некоторым ионам металлов, играющих роль кофакторов в активности ферментов основных метаболических путей. В большинстве случаев, фтор действует как ингибитор ферментов, но иногда он может стимулировать их активность. Механизмы зависят от типа фермента, концентрации и длительности действия фтора (Adamek E. et al., 2005). Так, в микромолярных дозах фтор считается эффективным анаболическим агентом, в то время как миллимолярные концентрации ингибируют различные ферменты, включая и фосфатазы (табл. 1).

Таблица 1.

Ингибирование металлсодержащих ферментов высокими концентрациями фтора (Кузина И.В., 2004; Adamek E. et al., 2005; Dabrowska E. et al., 2006; Rać M.E. et al., 2007; Mendoza-Schulz A. et al., 2009).

Ион металла	Фермент	Метаболический путь
Магний	Фосфоглюкомутаза Гексокиназа Глюкозо-6-фосфатаза Енолаза α -Кетоглутаратдегидрогеназа Пируваткиназа Дезоксирибонуклеаза Аргининосукцинатсинтетаза Глутаминсинтетаза	Синтез гликогена Фосфорилирование глюкозы Распад гликогена Гликолиз Цикл Кребса Гликолиз Расщепление ДНК Цикл мочевины Синтез аминокислот, обмен аммиака
Кальций	Аденозинтрифосфатазы Транскетолаза	Активный транспорт ионов Пентозофосфатный путь
Железо	Сукцинатдегидрогеназа Цитохромоксидаза Каталаза и пероксидаза	Цикл Кребса Перенос электронов на O_2 Антиоксидантная защита

Кроме того, ионы фтора способны связываться с функциональными группами аминокислотных остатков в активном центре ферментов, что также вызывает их ингибирование. Таким путём ингибируется активность Na^+, K^+ -АТФазы, что ведёт к истощению уровня АТФ в клетке и нарушению клеточного мембранного потенциала (Adamek E. et al., 2005). Снижение продукции АТФ вызывает увеличение уровня в клетке АМФ, АДФ, ГДФ и фосфора неорганического (Suska M., 2001). Изменение уровня адениннуклеотидного пула свидетельствует о снижении энергетического потенциала клетки и нарушении функций митохондрий (Дудченко А.М., Лукьянова Л.Д., 2004).

Хроническое действие высоких концентраций фтора изменяет также параметры углеводного и липидного обмена. Так, в экспериментах на мышах было показано развитие гипергликемии к 4 неделе фтористой интоксикации (García-Montalvo E.A. et al., 2009). При этом в β -клетках поджелудочной железы этих мышей был снижен уровень мРНК инсулина. Ионы фтора ингибируют также пен-

тозофосфатный путь окисления глюкозы, в частности фермент глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (Bergandi L. et al., 2010).

Анализ клинических данных показал увеличение в крови уровня α -холестерина, β -липопротеидов и триглицеридов у рабочих с профессиональным флюорозом (Филимонов С.Н. с соавт., 2004). Изменения уровня липидов находились в тесной корреляционной связи с продолжительностью действия соединений фтора на организм.

Соединения фтора оказывают влияние на уровень фосфолипидов в мембранах разных органов и сыворотке крови. Так, показано достоверное повышение лизофосфатидилхолина, сфингомиелина, фосфатидилсерина (детергентная фракция фосфолипидов) и снижение фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина в плазме крови, мембранах эритроцитов и клеток разных органов (печень, почки) (Байманова А.М., 1999; Кулкыбаев Г.А., 2006; Guan Z.Z. et al., 2000; Wang Y.N. et al., 2000). Фтористая интоксикация сопровождается и изменением количественного состава насыщенных и полиненасыщенных жирных кислот – в липидах эритроцитов, гепатоцитов преобладают повышенные уровни миристиновой (14:0), олеиновой (18:1;9), линолевой (18:2;9,12), достоверно снижается уровень арахидоновой кислоты (20:4;5,8,11,14) (Wang Y.N. et al., 2000). Важно, что изменения в составе жирных кислот происходят на фоне повышенной активности фосфолипазы A_2 и указывают на возможность нарушения синтеза эйкозаноидов – простагландинов, простациклинов, тромбоксанов и лейкотриенов (Крутецкая З.И. с соавт., 2003; Гвозденко Т.А. с соавт., 2006). Кроме того, изменения в уровне мембранных фосфолипидов и насыщенных и полиненасыщенных жирных кислот свидетельствуют о нарушении структуры мембран клеток – увеличивается их жёсткость, изменяются липид-белковые взаимодействия, что приводит к нарушению функционирования транспортных и ферментных систем клетки.

В целом, в настоящее время известно около 80 белков, активность которых обратимо изменяется ионами фтора. Практически все эти белки участвуют в основных метаболических процессах в организме.

Влияние соединений фтора на проницаемость клеточных мембран. Показано, что ионы фтора изменяют гомеостаз Ca^{2+} в клетках. Так, при фтористом воздействии сокращается транспорт Ca^{2+} по эндоплазматическому ретикулуму и через плазматические мембраны в клетках почек (Borke J.L., Whitford G.M., 1999), а также в саркоплазматическом ретикулуме кардиомиоцитов (Narayanan N. et al., 1991) в результате уменьшения количества Ca^{2+} -транспортирующих белков и ингибирования Ca^{2+} -насосов. В клетках нервной системы фтор ингибирует фермент фосфолипазу С, подавляя образование вторичного мессенджера диацилглицерина (ДАГ) и поступление Ca^{2+} в клетку (Козлова О.В. с соавт., 2008). Однако, в цитозоле клеток других тканей (эритроциты, остеобласты, проксимальные трубочки, фибробласты, эндотелиальные клетки) фтористая интоксикация увеличивала концентрацию Ca^{2+} (Zerwekh J.E. et al., 1990; Dominguez J.H. et al., 1991; Garcia J.G. et al., 1992; Davies A.S., Terhzaz S., 2009; Agalakova N.I., Gusev G.P., 2011).

С обменом Ca^{2+} тесно связан обмен фосфора. Показано, что соединения фтора ингибируют ферменты, регулирующие фосфорно-кальциевый обмен, в частности ингибируется активность 1α -гидроксилазы в проксимальных канальцах, в результате чего снижается продукция и содержание в сыворотке крови $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ – кальцитриола (Aftab M. et al., 2003). Фосфор может входить в клетку в виде P_i , а также в составе Na^+ - K^+ -АТФазы. Na^+ - K^+ -АТФаза создаёт электрохимический градиент для Na^+ необходимый для непрерывного транспорта P_i . Соединения фтора в эритроцитах, мозге, почках ингибируют Na^+ - K^+ -АТФазу, либо выступают в роли котранспортёров, в результате чего поступление фосфора в клетку снижается (Кравцова В.В., Кравцов О.В., 2004; Peerce B.E., 1995; Suketa Y. et al., 1995).

Соединения фтора нарушают функции митохондрий, вызывая падение мембранного потенциала и образование гигантской поры в их наружной мембране (Izquierdo-Vega J.A. et al., 2008). Следствием раскрытия поры является набухание митохондриального матрикса, разрыв наружной мембраны митохондрий и выход цитохрома с из межмембранного пространства. Потеря митохондриями цитохрома с приводит к торможению дыхательной цепи, подавлению синтеза АТФ и уси-

лению образования АФК (Владимиров Ю.А., 2002). Кроме того, нарушение барьерных свойств мембран митохондрий под действием ионов фтора приводит к развитию апоптоза (Anuradha C.D. et al., 2001).

Влияние фтора на редокс-статус клеток и процессы транскрипции и трансляции. Поддержание редокс-гомеостаза важно для жизнедеятельности клеток, поскольку его нарушение сопровождается повышением уровня АФК, ведущим к повреждению липидов, ДНК и белков.

Фтор является прооксидантом – под его действием в клетках увеличивается генерация O_2° (Izquierdo-Vega J.A. et al., 2008; García-Montalvo E.A. et al., 2009), H_2O_2 , OH° (Hassan H.A. et al., 2009) и оксида азота (NO) (Liu G. et al., 2003; Sireli M. et al., 2004).

Окислительный стресс является одним из механизмов цитотоксичности фтора, что было показано на различных экспериментальных моделях (табл.2). Соединения фтора ингибируют активность антиоксидантных ферментов – СОД, каталазы и глутатионпероксидазы. Нарушение баланса про- и антиоксидантов ведёт к активации свободнорадикальных процессов и повреждению мембранных структур клеток различных органов и тканей (Aydin G. et al., 2003; Cicek E. et al., 2005; Hassan H.A. et al., 2009).

В таблице суммированы данные по влиянию высоких концентраций фтора на соотношение прооксидантных и антиоксидантных систем в различных тканях. В представленных работах не учитывалась тканеспецифичность, нет динамики (данные представлены на одном сроке) и не изучены ранние проявления действия фтора в малых дозах.

На экспериментальной модели фтористой интоксикации у крыс (пероральное введение фторида натрия 10 мг/кг в течение 30 суток) показано повышение продуктов свободнорадикального окисления в сыворотке крови и в ткани печени (Коньк У.В. с соавт., 2001). При этом отмечено снижение уровня антиоксидантной защиты – активности каталазы и глутатионпероксидазы на 35 и 53%, соответственно. Нарушение баланса между про- и антиоксидантными процессами приводило к изменению мембранных структур эритроцитов и клеток печени. Так, в 2,7 раза увеличивался H_2O_2 -индуцированный гемолиз эритроцитов, в гепатоцитах за-

регистрировано нарушение структуры внутриклеточных органелл, уменьшение количества и распад пероксисом, появление липопротеидных гранул, уменьшение количества гранул гликогена.

Таблица 2.

Влияние ионов фтора на соотношение про- и антиоксидантов в клетках различных тканях (↑ – увеличение; ↓ – уменьшение)

Модель	Показатели	Литературная ссылка
Самцы крыс линии Вистар, F – 5 мг/кг массы тела в сутки, пероральное введение в течение 8 недель	↑ O ₂ [°] и СОД, ↓ митохондриального мембранного потенциала, активация свободнорадикального (СР) окисления	Izquierdo-Vega J.A. et al., 2008
Самцы швейцарских мышей, F – 50 мг/л в питьевой воде, в течение 10 недель	↑ АФК, ↓ СОД в крови, ↑ каталазы в печени	Mittal M., Flora S.J., 2007
Белые крысы, F – 100 мг/л в питьевой воде, в течение 4 месяцев	↑ уровень аскорбиновой кислоты, ↓ уровня мочевой кислоты в плазме; ↑ СР окисления, ↓ СОД в эритроцитах; ↑ СР окисления и активности глутатионпероксидазы в мозге и печени	Shanthakumari D. et al., 2004
Самцы крыс линии Вистар, F – 1, 10, 50 и 100 мг/л в питьевой воде, срок 12 недель	↑ АФК, ↓ восстановленного глутатиона в крови; ↑ АФК в печени, почках и мозге	Chouhan S. et al., 2010
Самцы-альбиносы крыс, F – 10,3 мг/кг массы тела в сутки перорально в течение 5 недель	↑ СР окисления, ↑ NO, ↓ СОД и каталазы, в печени	Hassan H.A. et al., 2009
Самцы крыс линии Вистар, F – 50 и 100 мг/л в питьевой воде, в течение 4 месяцев	↓ СОД в поджелудочной железе	Chlubek D. et al., 2003
Самцы и самки крыс линии Вистар, F – 50, 100 и 150 мг/л в питьевой воде в течение 3 месяцев	↑ СР окисления, ↓ СОД и глутатионпероксидазы в печени	Guo X.Y. et al., 2003
Самцы швейцарских мышей, F – 5 мг/кг массы тела в сутки, перорально в течение 8 недель	↑ АФК в эритроцитах, ↓ восстановленного глутатиона в крови, ↓ СОД, каталазы и глутатионпероксидазы, ↑ СР окисления в печени и почках	Mittal M. et al., 2006
Самцы крыс, пероральное введение NaF в дозе 10 мг/кг, в течение 30 дней	↑ СР окисления в эритроцитах и печени, ↓ каталазы и глутатионпероксидазы, ↑ СОД	Конык У.В. с соавт., 2001
Эндемичный флюороз, Китай (средний показатель концентрации в моче F 2 мг/л)	↓ СОД, каталазы и глутатионпероксидазы, ↑ СР окисления в сыворотке крови	Chen Q. et al., 2009
Эндемичный флюороз Индия, дети (средний показатель концентрации F в воде 5,53 мг/л)	↑ уровень аскорбиновой кислоты, ↓ уровень мочевой кислоты в плазме; ↑ СР окисления, ↓ восстановленного глутатиона, ↓ СОД и глутатионпероксидазы в эритроцитах	Shivarajashankara Y.M. et al., 2001

В экспериментах на кроликах показано, что в кардиомиоцитах в результате активации свободнорадикального окисления при фтористом воздействии наблюдаются деструктивные изменения митохондрий, эндоплазматического ретикулула, аппарата Гольджи, наружной клеточной оболочки и вставочных дисков (Власова Е.В., 2003).

Высокие концентрации фтора приводят к интоксикации организма, что подтверждается высоким уровнем глутатионтрансферазы и низким глутатионредуктазы в слюне больных флюорозом (Гаврилюк Л.А. с соавт., 2007). Снижение активности глутатионредуктазы при интоксикации фтором может свидетельствовать о подавлении пентозофосфатного пути окисления глюкозы. Так, у больных флюорозом активность ключевого фермента этого пути метаболизма глюкозы – α -глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (α -ГФДГ) была снижена на 35%. Ферменты глутатионредуктаза и α -ГФДГ являются сопряжёнными, поскольку около 65% НАДФН образуемого в пентозофосфатном пути окисления глюкозы используется глутатионредуктазой, а также для обезвреживания токсинов (монооксигеназный путь), синтеза липидов, стероидных гормонов и др. Исходя из этого, снижение активности пентозофосфатного пути может отражать и подавление анаболических процессов при фтористой интоксикации. Кроме того, существует обратная зависимость между содержанием глутатиона, активностью глутатионтрансферазы и степенью развития флюороза. Показано, что степень поражения флюорозом коррелирует с уменьшением содержания глутатиона и повышением активности глутатионтрансферазы в слюне больных. Такие же данные были получены и другими авторами (Shivarajashankara Y. M. et al., 2001; 2003).

Таким образом, в результате хронической фтористой интоксикации наблюдается нарушение баланса в про- и антиоксидантной системе. При этом существует корреляционная связь между клиническими признаками, отражающими степень патологии, и активностью ферментов антиоксидантной защиты.

Среди наиболее значимых механизмов действия неорганических соединений фтора на клетку выделяют влияние на процессы **транскрипции и трансляции**. До недавнего времени считалось, что фтор ингибирует данные процессы.

Однако современными исследованиями показана активация транскрипции и трансляции в различных тканях при фтористом воздействии.

Показано, что соединения фтора являются модуляторами транскрипции в разных типах клеток (Salgado-Bustamante et al., 2010). Так, с помощью метода рекомбинантных ДНК было выявлено 183 гена, экспрессию которых изменяют соединения фтора. В экспериментах на лабораторных мышах показана активация экспрессии 34 генов и подавление экспрессии 63 (Sun Z. et al., 2011). Активированы гены сигнальной трансдукции, окислительного стресса, апоптоза, факторов транскрипции p53 и NF- κ B тогда, как снижена экспрессия генов гликолиза, окислительного фосфорилирования, клеточного цикла и др.

Неорганические соединения фтора также участвуют в регуляции трансляции. Так, обнаружен синтез *de novo* 21 белка в сердце, 28 в остеобластах и 13 в почках (Xu H. et al., 2005; Xu H. et al., 2008; Lu J. et al., 2009). Большая часть этих белков при флюорозе регулирует окислительный метаболизм клеток и механизмы апоптоза. Показано увеличение уровня теломеразы, обратной транскриптазы, дисульфидизомеразы (участвует в фолдинге белков), митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) (Lu J. et al., 2009). Кроме того, происходит увеличение уровня белковых факторов, регулирующих процессы выживания/гибели клеток – c-fos, c-jun, каспазы 3 и 9 (Zhang W.L. et al., 2003).

Показан органоспецифический ответ на интоксикацию фтором, реализуемый за счёт системы фактора транскрипции HIF-1 и стресс-индуцибельных белков семейства HSP. Однако эти данные противоречивы и получены на моделях с высокими концентрациями фтора и при длительном их действии. Так, например, высокие концентрации фтора снижают уровень фактора транскрипции HIF-1 α , что приводит к подавлению синтеза защитных белков в клетках печени, остеобластах – HSP70, ферментов антиоксидантной защиты СОД, каталазы, глутатионпероксидазы (Otsuki S. et al., 2005; Chen Q. et al., 2009; Basha M.P., Sujitha N.S., 2011). При этом в почках уровень HSP70 был увеличен и коррелировал со степенью повреждения в клетках (Chattopadhyay A. et al., 2010).

Таким образом, в ответ на фтористую интоксикацию в клетке активируется или подавляется синтез различных белков, качественный состав которых зависит от концентрации и длительности воздействия фтора. Активируются системы срочного ответа, но ингибируются транскрипция и синтез структурных белков и ферментов, регулирующих метаболизм.

Влияние соединений фтора на пути внутриклеточной сигнализации и программируемой гибели клеток. Одной из важных систем, через которую формируется ответ клетки на действие факторов среды в норме и при патологических состояниях, является система внутриклеточной передачи сигнала.

Показано, что соединения фтора активируют каскады вторичных мессенджеров (Agalakova N.I., Gusev G.P., 2011). Так, неорганические соединения фтора активируют G-белки в клетках печени, поджелудочной железы, эндотелия (Li L., 2003). Основными эффекторами G-белков являются ферменты аденилатциклаза и фосфолипаза C. Показано, что NaF в организме способен образовывать комплексы с ионами металлов, в частности с ионами алюминия – AlF_4^- (Sternweis P.C., Gilman A.G., 1982). Молекула AlF_4^- является структурным аналогом фосфатной группы (PO_4^{3-}) и поэтому способна действовать на АТФ- и ГТФ-превращающие ферменты, действуя на многие метаболические реакции в клетке (Bigay J. et al., 1987). AlF_4^- способен проходить через клеточную мембрану и взаимодействовать с мембранно-связанной α -субъединицей G-белка, в результате чего образуется комплекс $G\alpha - ГДФ - AlF_4^-$. Это комплекс активирует G-белок с последующей стимуляцией различных внутриклеточных путей передачи сигнала – протеинкиназу A, протеинкиназу C, фосфатидилинозитол-3-киназу и др. (Refsnes M. et al., 2003; Xu H. et al., 2006; Reyland M.E., Bradford A.P., 2010).

Неорганические соединения фтора оказывают влияние на систему циклических нуклеотидов – циклические аденозинмонофосфат (цАМФ) и гуанозинмонофосфат (цГМФ) (Refsnes M. et al., 2003). Изменение уровня циклических нуклеотидов регулирует степень фосфорилирования соответствующих белков, что и определяет активность и направление метаболических процессов. Однако цАМФ и цГМФ являются не только вторичными посредниками, но и сами регулируют

многие функции организма. Показано, что цАМФ обладает плейотропным свойством, мобилизирующим энергетические и функциональные возможности всех органов и тканей (Софронова Е.В., Кузьмина Л.П., 2007). К основным проявлениям стимулирующего действия цАМФ относят: **1)** усиление процессов кроветворения; **2)** усиление гемодинамики (тахикардия, повышение артериального давления); **3)** уменьшение скорости свёртывания крови за счёт снижения агрегации тромбоцитов; **4)** усиление гуморального (синтез и экскреция иммуноглобулинов) и торможение тканевого иммунитета; **5)** гликогенолитическое и липолитическое действия.

Увеличение концентрации цАМФ и цГМФ было показано в крови и моче у больных с флюорозом и профессиональной бронхиальной астмой (Строчкова Л.С., Сороковой В.И., 1983; Кузьмина Л.П. с соавт., 2004; Susheela A.K., Sing M., 1982). При этом внутриклеточное содержание цАМФ в различных органах (сердце, печень, почки, надпочечники) было увеличено в результате повышенной активности фермента аденилатциклазы. Показано, что активирующее действие фтора на аденилатциклазу в несколько раз превышает влияние гормонов, в частности норадреналина (Окунев В.Н. с соавт., 1987). Кроме того, в условиях ХФИ происходит изменение соотношения цАМФ/цГМФ за счёт значительного превышения цАМФ (Разумов В.В., 2003; Кузьмина Л.П. с соавт., 2004).

В настоящее время появились работы о роли соединений фтора в индукции программируемой гибели клеток – апоптоза и некроза. Так, высокие концентрации фтора вызывают некроз гепатоцитов (Ghosh J. et al., 2008) и тимоцитов (Matsui H. et al., 2007). Показано, что в развитие некроза вовлечены АФК и увеличение уровня внутриклеточного Ca^{2+} .

Фтор является индуктором апоптоза в лейкоцитах (Gutierrez-Salinas J. et al., 2010), фибробластах (Karube H. et al., 2009), альвеолоцитах и эпителиальных клетках лёгкого (Thrane E.V. et al., 2001). Механизмы фтор-индуцированного апоптоза включают: **1)** повышение уровня АФК и активация свободнорадикального окисления (Gutierrez-Salinas J. et al., 2010); **2)** повреждение митохондрий и активация митохондриального пути включения апоптоза (Matsui H. et al., 2007;

Karube H. et al., 2009), который требует экспрессии про- и антиапоптотических генов, синтеза de novo мРНК и белка – Bcl-2, p53 (Lee J.H. et al., 2008; Flora S.J. et al., 2009); 3) увеличение внутриклеточного уровня Ca^{2+} и увеличение количества клеток экспрессирующих маркер апоптоза – аннексин V (Matsui H. et al., 2007); 4) активация каспазного каскада – каспазы 3, 8 и 9 (Zhan A.X. et al., 2006; Lee J.H. et al., 2008; Wang H. et al., 2009); 5) изменение активности внутриклеточных сигнальных путей – повышение активности протеинкиназы C (Refsnes M. et al., 2002; 2003), MAPK (Thrane E.V. et al., 2001; Karube H. et al., 2009).

Таким образом, фтор можно рассматривать как цитотоксический фактор, участвующий в изменении метаболизма, модуляции путей внутриклеточной сигнализации и активации программируемой гибели клеток.

Избыточное поступление фтора ведёт к многочисленным структурным изменениям в организме и оказывает влияние на его физиологические функции. Патфизиологические механизмы острого и хронического отравления высокими концентрациями фтора изучены достаточно хорошо. Однако, данные о ранних, преморбидных метаболических изменениях немногочисленны и противоречивы, а именно они являются ориентирами для профилактических мероприятий. Кроме того, чаще всего действие фтора на организм оценивают по изменениям в минерализующихся тканях и по биохимическим параметрам сыворотки крови, поэтому малоизвестно о состоянии других тканей и органов.

Учитывая это, в нашей работе впервые проведено комплексное изучение уровня свободнорадикального окисления, внутриклеточных защитных систем, активности ферментов основных метаболических путей и морфологические изменения в сердце, лёгких и печени при действии субхронического поступления фторида натрия в организм.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 205 белых крысах-самцах массой 200-250 г одного возраста. Во время экспериментов животные содержались при свободном доступе к пище и воде, а также естественном чередовании суточной освещённости. 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).

Содержание животных и проведение экспериментов соответствовало международным правилам «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» (Страсбург, 1986), «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ № 755 от 12.08.1977; приказ № 1179 от 10.10.83).

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.

В работе использовали общепринятые стандартные методики биохимических исследований. Спектр показателей включал определение:

в тканях (сердце, лёгкие, печень):

– уровня защитных белков, являющихся компонентами редокс-сигнальной системы – фактора транскрипции HIF-1 α , конститутивных форм белков – HSC73, гем-оксигеназы-2 (HOx-2) и индуцибельных – HSP72, HOx-1 методом Western-блот анализа;

– резистентности мембранных структур к активации свободнорадикального окисления;

– активности ферментов антиоксидантной защиты – СОД (Fridovich I., 1972) и каталазы (Luck H., 1963);

– 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 – аспаратаминотрансфераза: 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.

2.1. Гомогенизирование тканей

Замороженные образцы перед гомогенизированием взвешивали для определения точного объема среды гомогенизирования. Изолированные сердца или лёгкие измельчали гомогенизатором Ultra-Turrax 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 (рН 7,2 при 0°C) в соотношении ткань:среда равном 1:8 для сердца и 1:10 для лёгких. Ткань печени измельчали гомогенизатором тefлон-стекло при 800 об/мин в течение 1 мин в стандартной среде гомогенизирования при соотношении ткань:среда, равном 1:12.

2.2 Метод Western-блот анализа

Уровень защитных белков HIF-1 α , HSC73, HOx-2, HSP72 и HOx-1 определяли в цитоплазматической фракции сердца, лёгких и печени. Ткань гомогенизировали, как описано выше при 4°C в лизирующем буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl, 5 мМ EDTA, 1 мМ DTT и 1% Triton X-100 рН 7,5 (соотношение ткань:среда – 1:6 по весу). Гомогенат фильтровали через 6 слоёв марли и центрифугировали в течение 30 мин при 12000 g (4°C). Белки разделяли в 8 или 10% полиакриламидном геле и переносили на PVDF мембрану с помощью электроэлюции. Преинкубацию Western-блотов проводили в TBST с 1% Tween-20, содержавшем 5% обезжиренное молоко (1 час). В качестве положительного контроля использовали образцы, выделенные из тимуса крыс и из клеток H35, подвергнутых тепловому воздействию (41,5°C, 30 мин). Western-блоты инкубировали в присутствии первых моноклональных антител к HIF-1 α , HSC73, HOx-2, HSP72 и HOx-1 (Stressgen) в разведении 1:1000 в течение 1 часа, промывали и инкубировали в течение 90 мин в присутствии вторых антител, конъюгированных с пероксидазной меткой (Jackson Immuno Research) (1:2000). Детектирование HIF-1 α , HSC73, HOx-2, HSP72 и HOx-1 проводили с использованием ECL реагентов (Kodak film). О содержании HIF-1 α , HSC73, HOx-2, HSP72 и HOx-1 судили по плотности окрашивания полосы связывания антител с белком. Количественная обработка полученных иммуноблотов проводилась путём сканирования и обработки с помощью компьютерной программы Photoshop. Результаты выражали в относительных денситометрических единицах (ОДЕ).

2.3. Определение активности ферментов антиоксидантной защиты – каталазы и СОД

Активность ферментов антиоксидантной защиты определяли при 37°C (25°C для супероксиддисмутазы – СОД) в линейной области концентрационной

зависимости от субстрата или продукта реакции. Стандартная инкубационная среда состояла из 40 мМ TRIS, 2 мМ ЭДТА, 100 мМ KCl, pH 7,4 при объёме 1 мл.

Активность каталазы определяли по потреблению H_2O_2 , регистрируемому при 240 нм на спектрофотометре Hitachi-557 (Luck H., 1963). Реакция начиналась добавлением 0,2 мг белка гомогената к инкубационной среде, содержащей 2 мМ H_2O_2 . Ферментная активность выражалась в мкмольях H_2O_2 /г белка за 1 мин. Расчёт проводили по начальной скорости разложения перекиси водорода с учётом коэффициента молярной экстинкции $\epsilon = 34,2 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ л.

Активность общей СОД определяли по методу Fridovich I. (1972) при регистрации разницы между скоростью образования супероксидного анион-радикала в системе ксантин – ксантиноксидаза до и после добавления гомогената в модельной системе гипоксантин (0,1 мМ)/ксантиноксидаза (0,004 ед.). Образование супероксидного анион-радикала определяли спектрофотометрически (560 нм) по скорости образования формазана из тетранитротетразолиевого синего (25 мкМ). Перед определением активности СОД проводили удаление гемоглобина из супернатанта с помощью экстракции смесью хлороформ:метанол (3:5 по объёму). Для этого 0,1 мл гомогената интенсивно перемешивали с 1,9 мл холодной H_2O , 0,5 мл метанола, 0,3 мл хлороформа и центрифугировали при 2300 g в течение 10 мин. Активность СОД определяли в верхней фракции, добавляя аликвоты 300-500 мкл в 3 мл инкубационной среды, содержащей 17 мМ пиррофосфатный буфер ($Na_4P_2O_7 \times 10H_2O$, pH 8,3 при 25°C), 0,1 мМ ксантин, 0,1 мМ ЭДТА, тетранитротетразолиевый синий (0,05 мМ), 1% тритон и ксантиноксидазу. Полученный супернатант добавляли в инкубационную среду в количестве (~ 0,07 мг белка), необходимым для ингибирования образования супероксидных радикалов на 40-60%. В контроле начальная скорость восстановления тетранитротетразолиевого синего составляла 0,016-0,024 A_{560} /мин. За единицу активности СОД принимали количество фермента, необходимое для 50% ингибирования реакции восстановления тетранитротетразолиевого синего в формазан.

2.4. Определение резистентности мембранных структур тканей к индукции свободнорадикального окисления *in vitro*

Для изучения резистентности тканей к индукции свободнорадикального окисления *in vitro* гомогенаты сердца, печени и лёгких инкубировали при 37°C в среде, содержащей 20 мМ TRIS-HCl (pH 7,4), 100 мМ NaCl и аскорбат (0,2 мМ) в конечном объёме 2,2 мл (при концентрации белка не выше 2,5 мг на мл). Раствор аскорбиновой кислоты готовили непосредственно перед опытом. Отбор проб на определение концентрации ТБК-активных продуктов проводили сразу после добавления индуктора (0 мин) и через определённое время от начала окисления (сердце и печень – 20 мин, 40 мин и 60 мин; лёгкие – 15 мин, 30 мин и 45 мин) (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). Реакцию проводили, добавляя к 1,5 мл ТБК-реагента, содержащего 0,4% ТБК, 0,54% SDS и 10% уксусную кислоту (pH 3,5), 0,25 мл инкубационной смеси и 0,25 мл воды. После преинкубации смесь нагревали до 95°C и инкубировали еще 60 мин, применяя обратные холодильники для каждой пробы во избежание выпаривания смеси. После развития окраски образцы центрифугировали при 1400 g в течение 10 мин и оптическую плотность регистрировали при 532 нм, по максимуму спектра поглощения ТБК-активных продуктов в диапазоне 500-570 нм (Архипенко Ю.В. с соавт., 1989). Концентрацию ТБК-активных продуктов выражали в единицах оптической плотности.

2.5. Представление данных

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 исследований в таблицах представлены в виде тройки цифр – нижний квартиль (25% перцентиль) – медиана – верхний квартиль

(75% перцентиль), дающих представление о центральной тенденции, ширине и асимметрии распределения результатов. Результаты экспериментов на рисунках представлены в виде медианы.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние субхронического воздействия фторида натрия на компоненты редокс-сигнальной системы – динамика и органоспецифичность развития ответа

Ранее было показано, что при действии на организм высоких концентраций фтора повышается образование АФК и нарушается баланс прооксидантов и антиоксидантов, что приводит к свободнорадикальному повреждению различных органов и тканей (Конык У.В. с соавт., 2001; Aydin G. et al., 2003; Cicek E. et al., 2005; Hassan H.A. et al., 2009). С другой стороны, АФК являются важным компонентом внутриклеточной редокс-сигнальной системы, инициация которой обеспечивает мобилизацию защитных механизмов в ответ на действие повреждающих факторов (Сазонтова Т.Г. с соавт., 2007). Важную роль в реализации этих защитных механизмов играют фактор транскрипции HIF-1 α и белки срочного ответа семейства HSP.

В связи с этим, изменение уровней HIF-1 α , конститутивных (HSC73, HOx-2) и индуцибельных (HSP72, HOx-1) белков семейства HSP в тканях может выступать в качестве маркера развития компенсаторно-приспособительных механизмов (Андреева Л.И. с соавт., 2009) и нарушения про- и антиоксидантного баланса в организме в условиях действия повреждающих факторов окружающей среды. Однако в настоящее время отсутствуют данные об органоспецифических особенностях изменения свободнорадикальных процессов и уровня внутриклеточных защитных белков в динамике действия субхронического воздействия фторида натрия.

Поэтому в работе изучали органоспецифические особенности субхронического воздействия фторида натрия на компоненты редокс-сигнальной системы – активность свободнорадикальных процессов и внутриклеточных защитных белков.

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

Фторид натрия при длительном воздействии и в высоких концентрациях обладает кардиотоксическим действием. Являясь прооксидантом, он повышает уро-

вень АФК в клетке и ингибирует внутриклеточные защитные системы, что ведёт к повреждению ткани миокарда (Garcia-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. 3). 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. 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. Так из табл. 3 видно, что в миокарде на 3-и сутки активность СОД и каталазы превышала контрольный уровень на 49% и

5%, на 6-ые сутки снижалась до контроля, а через 3 недели регистрировалось новое увеличение их активности – на 57% и 32%, соответственно.

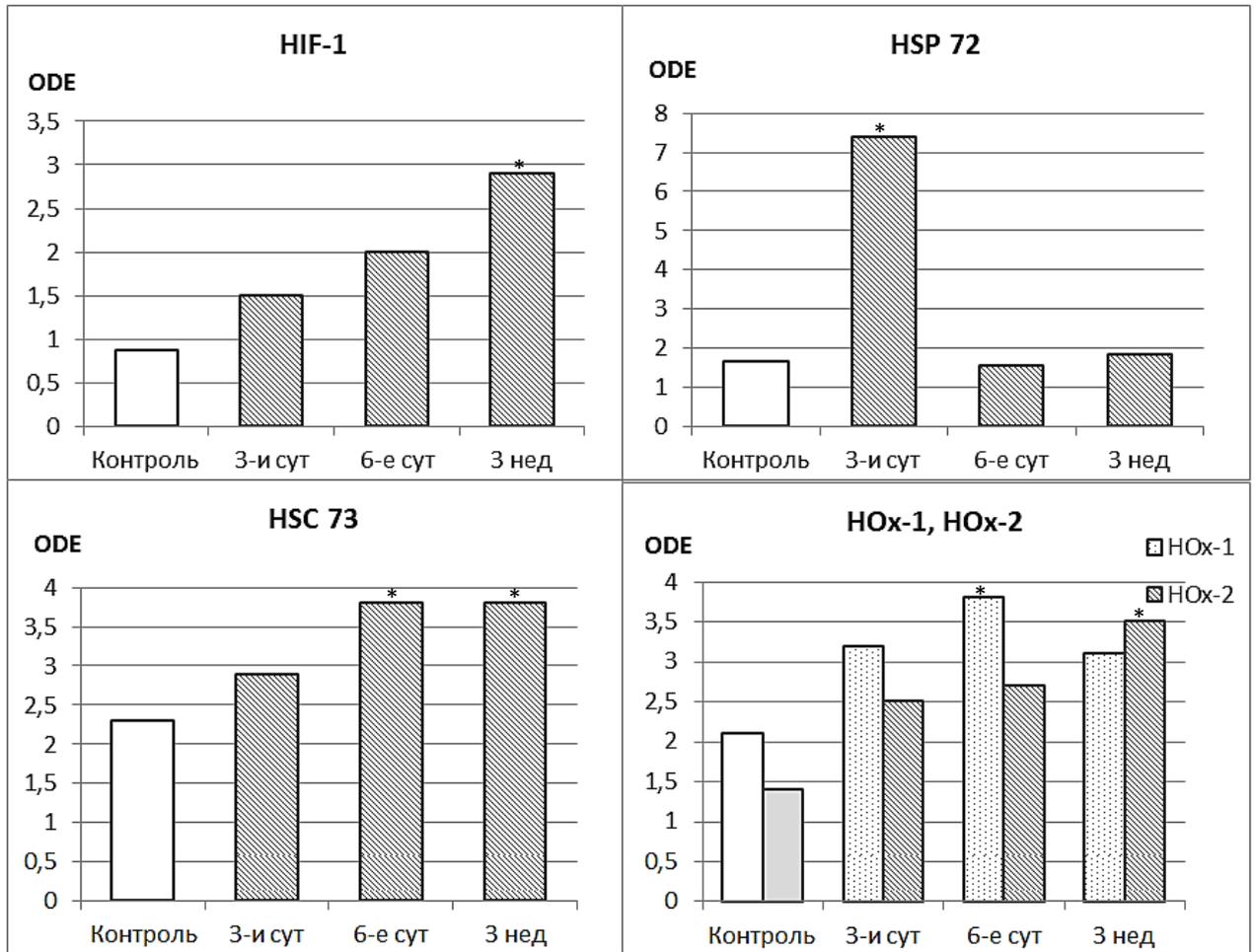


Рис. 3. Уровень защитных белков в миокарде экспериментальных крыс при субхроническом действии фторида натрия.

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 миокарде крыс при субхроническом воздействии фторида натрия

Сроки эксперимента	СОД, у.е./г белка		Каталаза, мкМ H_2O_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.

Увеличение уровня HIF-1 α коррелировало с изменением активности ферментов, ответственных за поддержание метаболизма в ткани сердца (табл. 4). 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%.

Таблица 4.

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 сут	112,4	128,0*	56,2	100,9*	1297	2753*	1705	3154*	1,03	0,96
6-ые сут	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).

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 в указанные сроки действия фторида натрия является компенсаторным и необходимо для снижения интенсивности свободнорадикальных процессов в кардиомиоцитах. Действительно, в 1-ые сутки субхронического воздействия фторида натрия наблюдалась активация свободнорадикальных процессов (рис. 4) – увеличивались начальный уровень продуктов окисления на 60% и чувствительность мембранных структур миокарда к индукции свободнорадикального окисления (40 мин индукции окисления на 17%, через 60 мин – на 34%).

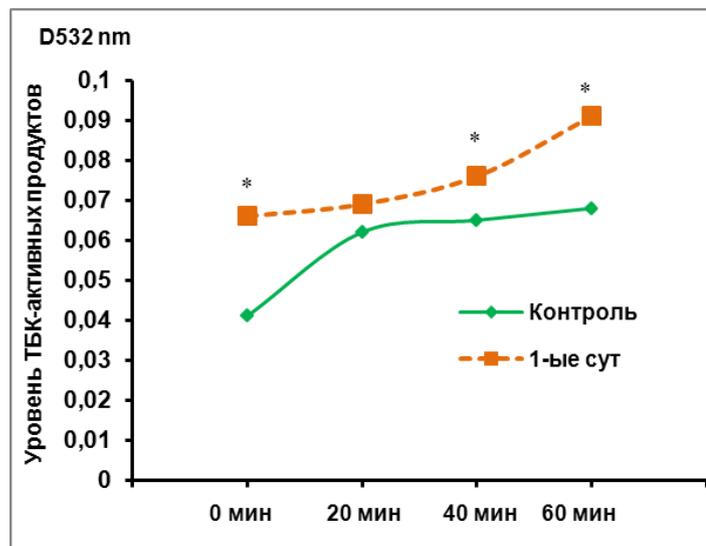


Рис. 4. Влияние субхронического действия фторида натрия на чувствительность мембранных структур миокарда к индукции свободнорадикального окисления *in vitro*.
Примечание: D – оптическая плотность при 532 nm; 0 мин, 20 мин, 40 мин, 60 мин – время окисления, индуцированного *in vitro*; * – достоверность отличий ($P \leq 0,05$) по сравнению с контролем (Mann-Whitney U test); данные представлены в виде медианы.

Однако к 3 неделе чувствительность мембранных структур миокарда к индукции свободнорадикального окисления *in vitro* не отличалась от контрольных значений (рис. 5), 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 (табл. 3). Так, активность СОД увеличивалась на 6 и 9 неделях в 1,6 и 1,5 раза, а на 12 неде-

ле снижалась в 1,5 раза по сравнению с контролем. Активность каталазы была повышена на 47% только на 9 неделе эксперимента.

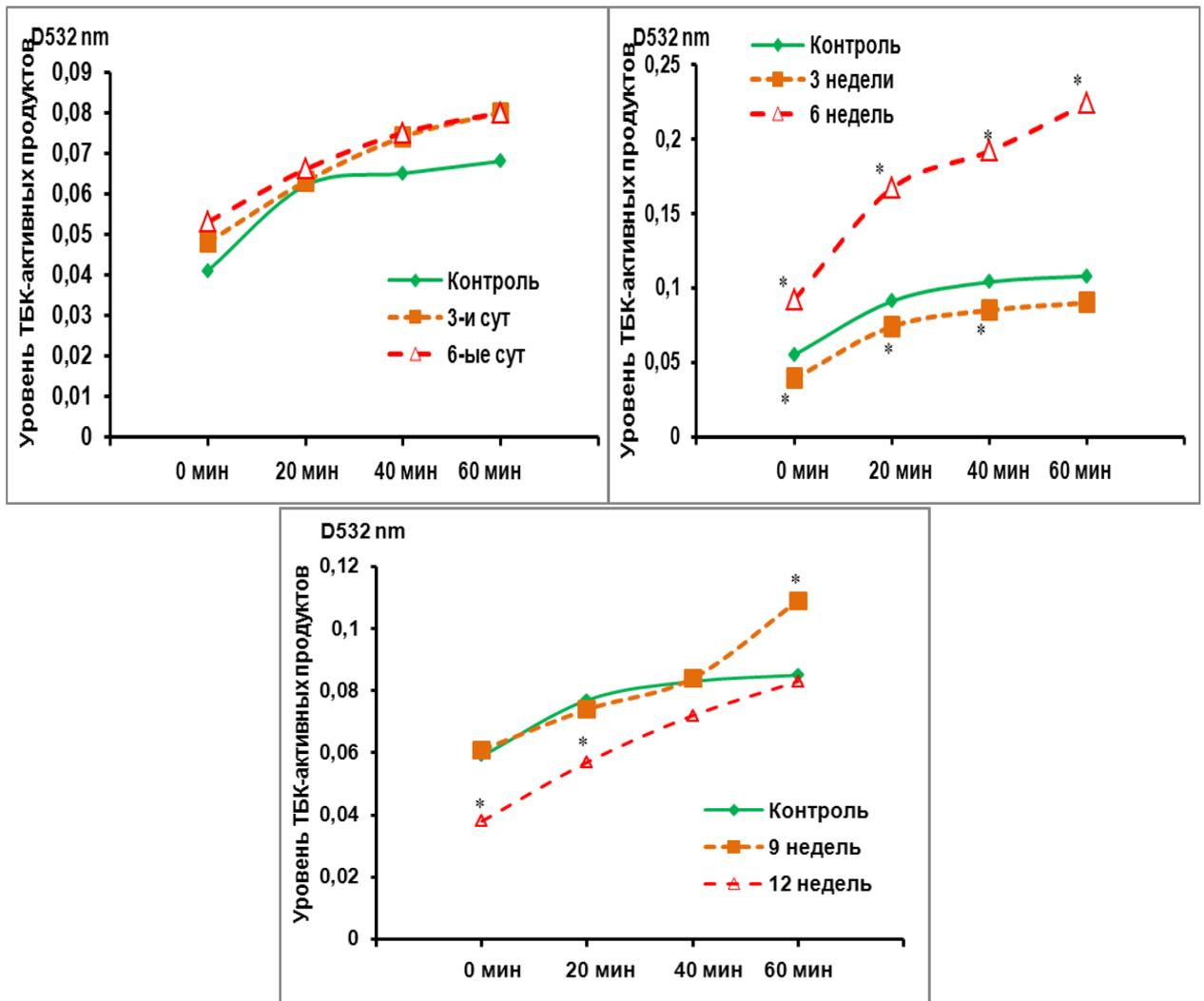


Рис. 5. Влияние субхронического действия фторида натрия на чувствительность мембранных структур миокарда к индукции свободнорадикального окисления *in vitro*. **Примечание:** D – оптическая плотность при 532 nm; 0 мин, 20 мин, 40 мин, 60 мин – время окисления, индуцированного *in vitro*; * – достоверность отличий ($P \leq 0,05$) по сравнению с контролем (Mann-Whitney U test); данные представлены в виде медианы.

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 (рис. 5). Однако к 12 неделе эксперимента зарегистрировано снижение интенсивности свободнорадикальных процессов, по сравнению с контролем (рис. 5).

Возможно это 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 GroI (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 (табл. 4).

Таким образом, на поздних сроках действия фторида натрия (с 6 недели) в ткани сердца была выявлена активация свободнорадикальных процессов, которая в данном случае выполняет регулирующую 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 (табл. 4): 1) на 6 неделе за счёт усиления роли 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 выяв-

лены 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).

В работе нами был разработан алгоритм описания полученных гистологических снимков, позволяющий качественно выражать изменения в тканях, вызванные субхроническим воздействием фторида натрия. Для этого была создана специальная шкала, которая позволила учесть степень патологических изменений – слабовыраженные (+), средневыраженные (++) и сильновыраженные (+++). Результаты описания гистологических снимков миокарда крыс на поздних сроках действия фторида натрия с использованием разработанного алгоритма представлены в таблице 5.

Таблица 5.
Гистопатологические изменения в миокарде крыс на поздних сроках субхронического воздействия фторида натрия

Повреждение органа	6 недель	9 недель	12 недель
Патологическое изменение формы кардиомиоцитов	+	+	++
Степень выраженности очаговой лимфоцитарной инфильтрации межмышечных пространств	+	+	+
Частота встречаемости сосудов мышечно-эластического типа в состоянии дистрофии	+	++	+++
Межмышечный отёк (степень выраженности)	+	+	++
Периваскулярный отёк (степень выраженности)	+	+	+
Периваскулярный фиброз	+	+	++
Дистрофия кардиомиоцитов	+	+	++
Микроциркуляторные расстройства (стаз эритроцитов)	++	+++	+++

Примечание: + – слабовыраженные изменения; ++ – средневыраженные изменения; +++ – сильновыраженные изменения

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 – HIF-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.

3.2. 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 изменений. При этом особенности свободнорадикальных реакций и изменение метаболизма в лёгочной ткани при субхроническом воздействии фторида натрия остаются малоизученными.

Из рис. 6 видно, что на ранних сроках поступления фторида натрия в организм резистентность мембранных структур лёгких к индукции свободнорадикального окисления не снижена от контроля. Такая компенсация свободноради-

кальных процессов в лёгких сопровождалась значительной активации внутриклеточных защитных систем, как белков срочного ответа, так и ферментов антиоксидантной защиты (рис. 7, табл. 6). 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 (рис. 7). Активность антиоксидантного фермента – каталазы повышалась на 3-и и 6-ые сутки, а к 3 неделе действия фторида натрия снижалась (табл. 6).

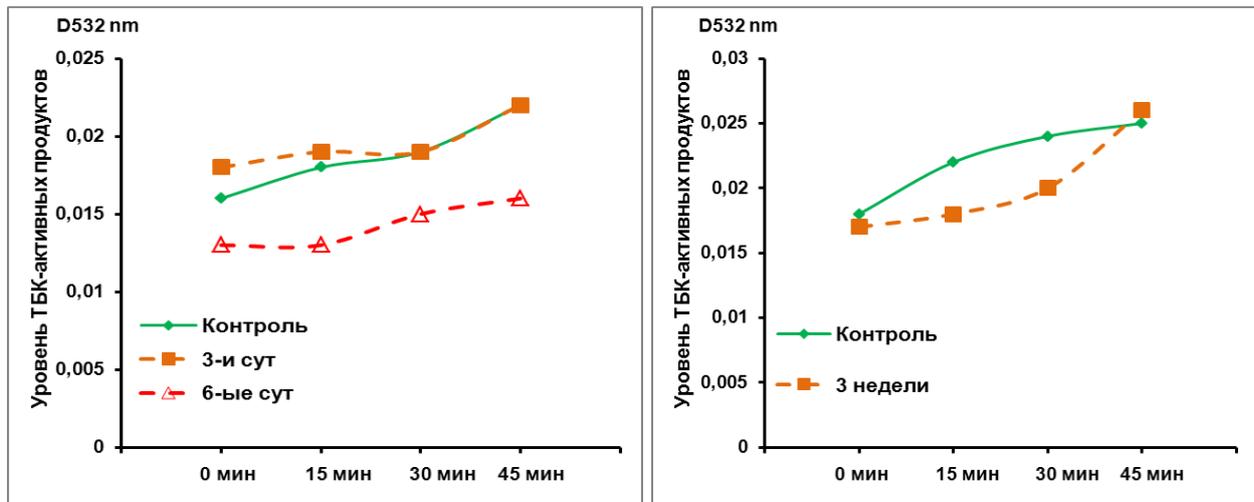


Рис. 6. Влияние субхронического действия фторида натрия на резистентность мембранных структур ткани лёгких к индукции свободнорадикального окисления *in vitro* на ранних сроках

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.

Таблица 6.

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

Сроки эксперимента	СОД, у.е./гр. белка		Каталаза, мкМ H ₂ O 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.

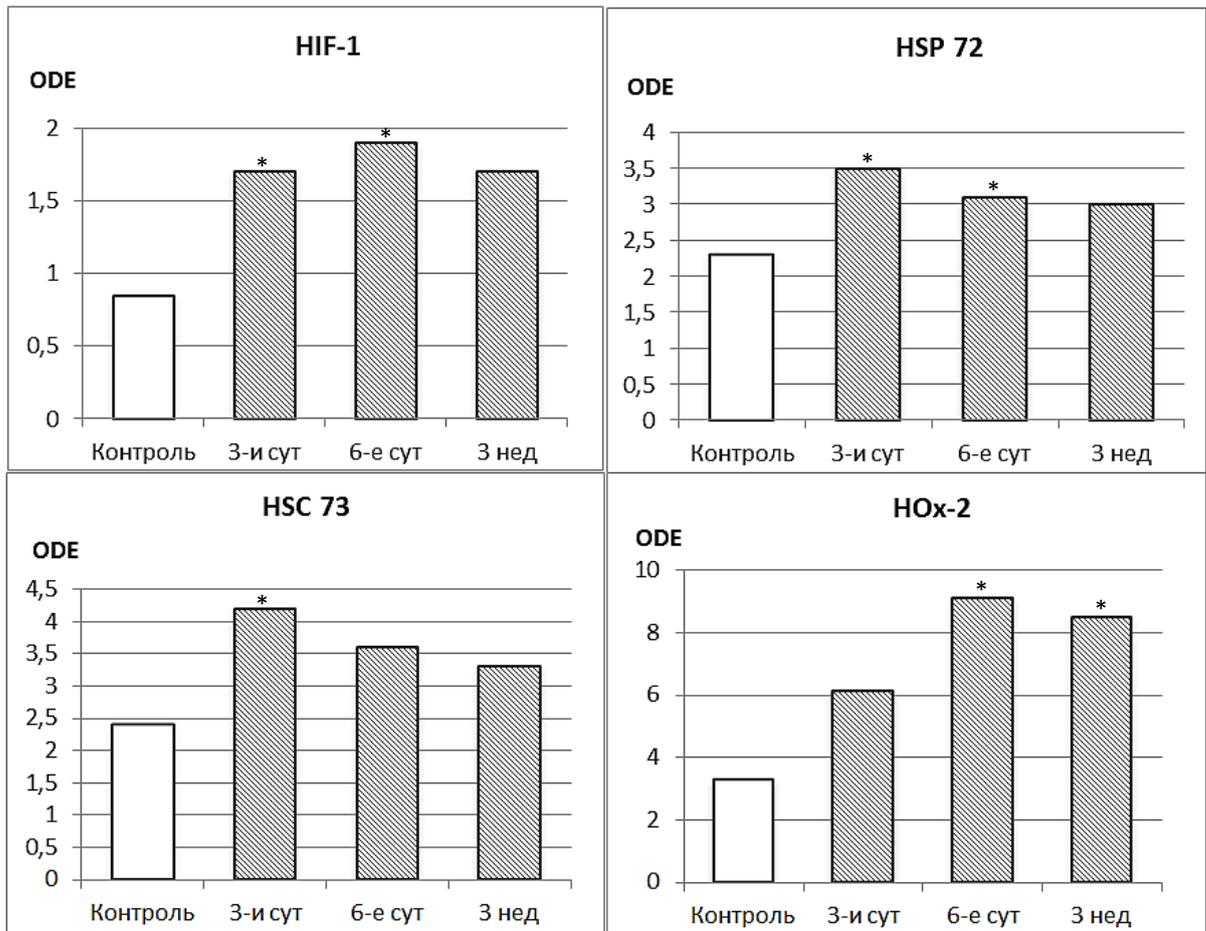


Рис. 7. Уровень защитных белков в ткани лёгких экспериментальных крыс при субхроническом действии фторида натрия

Примечание: ODE – относительные денситометрические единицы

* – достоверность отличий ($P \leq 0,05$) по сравнению с контролем (Mann-Whitney U test).

Таблица 7.

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

Рост уровня внутриклеточных защитных белков на ранних сроках действия фторида натрия в лёгких сопровождался изменением интенсивности функционирования ферментов основных метаболических путей (табл. 7).

Так, на 3-и и 6-ые сутки резко увеличивалась активность АсАТ (в 4-12 раз), что может свидетельствовать о значительной активации цикла Кребса и окислительного фосфорилирования в митохондриях (Рослый И.М., Водолажская М.Г., 2010). Изменение активности АсАТ коррелировало с уровнем стресс-индуцибельного белка HSP72, действие которого направлено в том числе и 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. 7). 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 энергодифицитных 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). Действительно из табл. 7 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, энергодифицит 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 зна-

чительное снижение (в 3 раза) активности мембраносвязанного фермента γ -ГТ. На 12 неделе зарегистрирован компенсаторный рост АЛТ (увеличение в 1,3 раза по сравнению с контролем) и восстановление до контрольных значений активности ЩФ и γ -ГТ (табл. 7), что имеет адаптивный характер и подтверждается снижением в лёгких интенсивности свободнорадикального окисления (рис. 8). Такое повышение резистентности мембранных структур лёгких на 12 неделе действия фтора в малых дозах могло происходить за счёт увеличения в 1,3 раза активности антиоксидантных ферментов СОД и каталазы (табл. 6), а кроме того окисления жирнокислотных остатков фосфолипидов мембран.

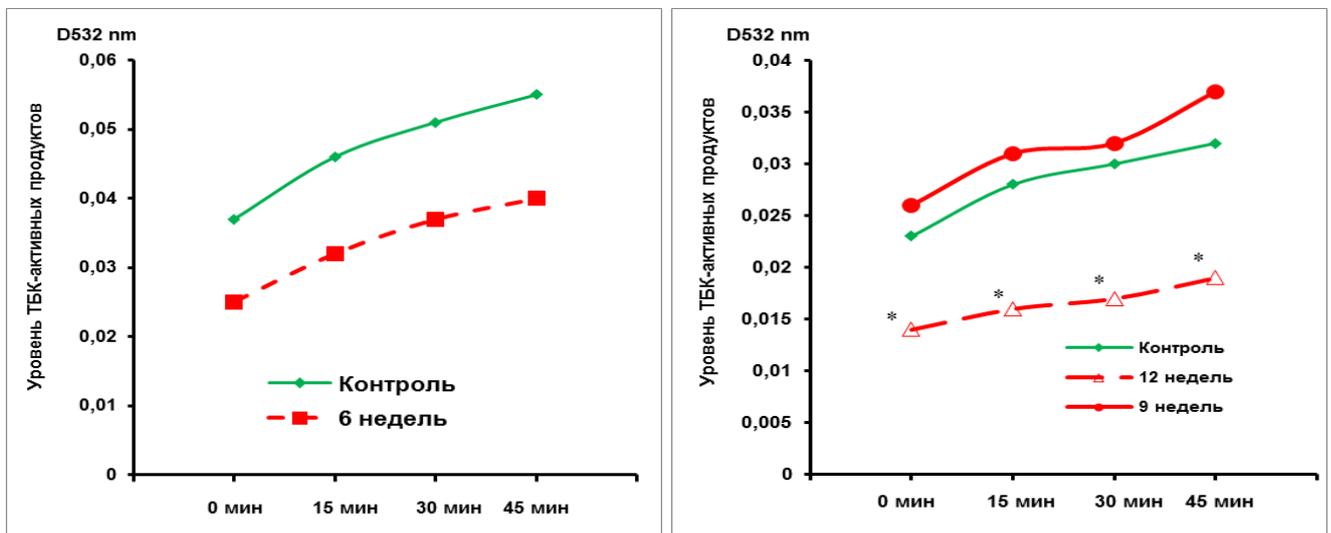


Рис. 8. Влияние субхронического действия фторида натрия на резистентность мембранных структур ткани лёгких к индукции свободнорадикального окисления *in vitro* на поздних сроках

Примечание: D – оптическая плотность при 532 nm; 0 мин, 15 мин, 30 мин, 45 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.

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 интер-

стиции лёгких волокнистой соединительной ткани, периваскулярный отёк (табл. 8).

Таблица 8.

**Гистопатологические изменения в ткани лёгких на поздних сроках
субхронического воздействия фторида натрия**

Повреждение органа	6 недель	9 недель	12 недель
Лимфоплазмоцитарная инфильтрация	++	++	+++
Утолщение межальвеолярных перегородок	+	++	+++
Утолщение стенки сосудов лёгких	+	++	+++
Признаки фиброза	++	++	+++
Периваскулярный отёк	+	++	+++
Полнокровные сосудов с явлениями стаза и сладжа	+	++	+++
Дистрофические изменения альвеолярного эпителия	+	++	+++

Примечание: + – слабовыраженные изменения; ++ – средневыраженные изменения; +++ – сильновыраженные изменения

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.

3.3. 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 окислитель-

ного стресса, обусловленного избыточным образованием АФК. Однако, в настоящее время мало известно 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.

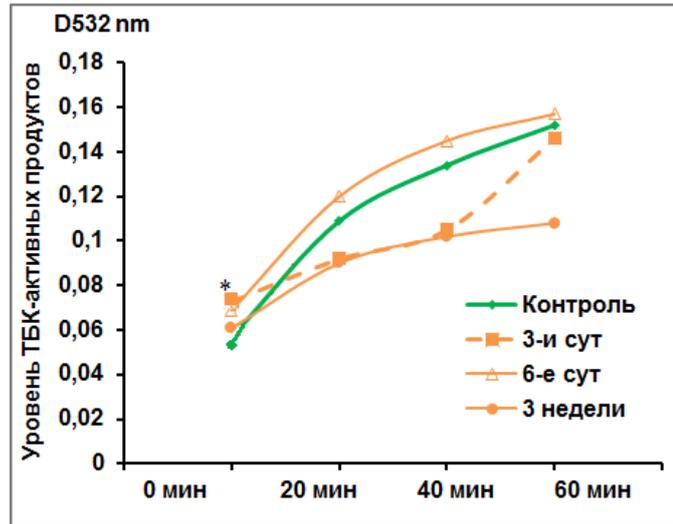


Рис. 9. Влияние субхронического действия фторида натрия на резистентность мембранных структур печени к индукции свободнорадикального окисления *in vitro* на ранних сроках

Примечание: 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. 9 видно, что на 3-и сутки действия фторида натрия в клетках 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 NIF-1 α , которое приводило к росту HSP72, HSC73, HOx-1 и HOx-2 (рис. 10).

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.

В последнее время показано (Евдониин 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 кровотоки. 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 противовоспалительных IL-4 и IL-10 (Михайлова Н.Н. с соавт., 2013).

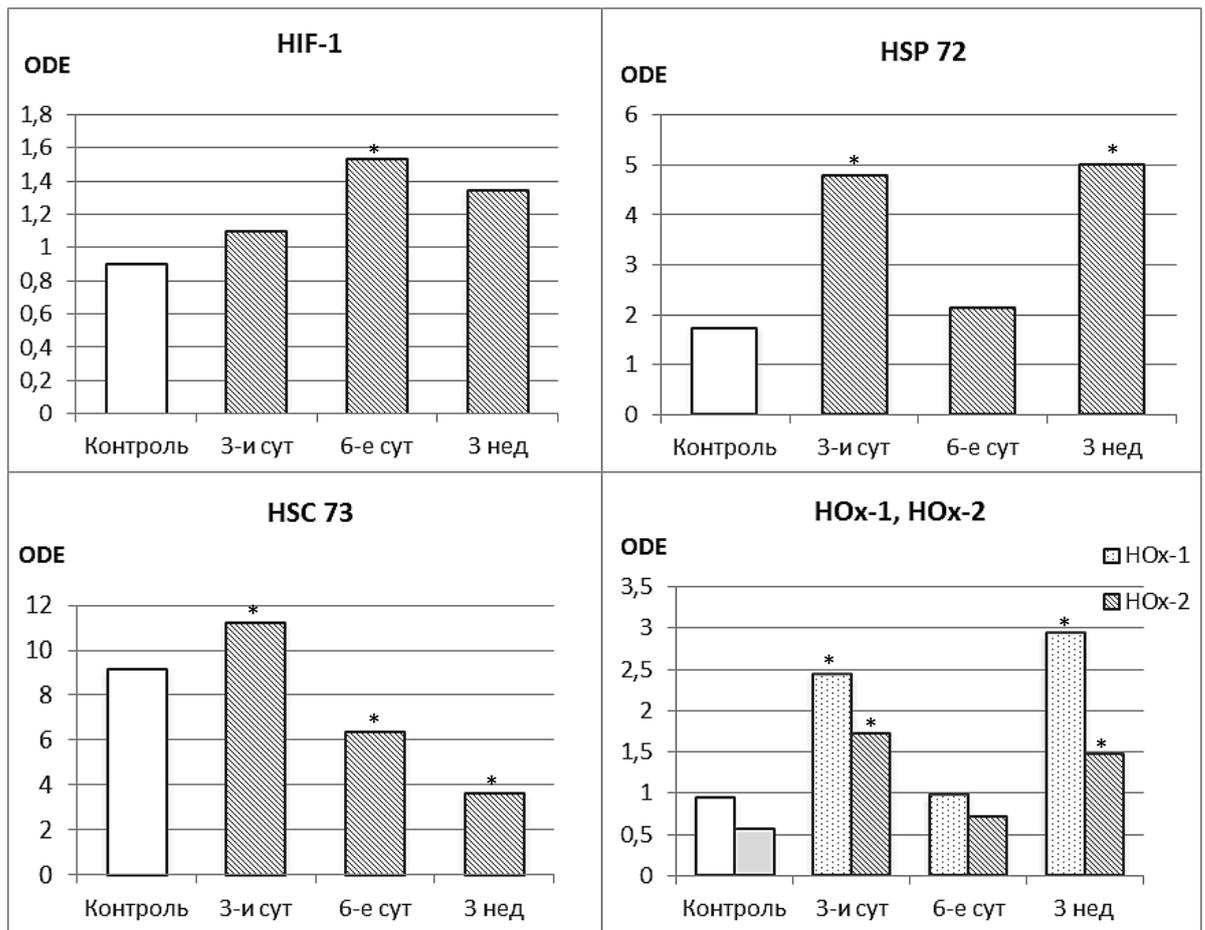


Рис. 10. Уровень защитных белков в клетках печени экспериментальных крыс при субхроническом действии фторида натрия.

Примечание: ODE – относительные денситометрические единицы

* – достоверность отличий ($P \leq 0,05$) по сравнению с контролем (Mann-Whitney U test).

Помимо активации белков семейства HSP транскрипционный фактор NIF-1 α оказывает триггерное влияние на ферменты антиоксидантной защиты в печени (табл. 9).

Таблица 9.

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.

Видно, что 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 (рис. 9).

Одновременно с активацией синтеза защитных белков при субхроническом действии фторида натрия происходило изменение активности ферментов основных метаболических путей в печени (табл. 10).

Таблица 10.

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

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 HIF-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 фтора, которые показали ингибирование ферментов цикла Кребса и компенсаторное увеличение активности ферментов гликолиза. Помимо регуляции активности ферментов энергетического обмена HIF-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. 9).

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.

Увеличение сроков поступления фторида натрия в организм больше 3 недель приводило к разнонаправленным изменениям метаболизма в ткани печени.

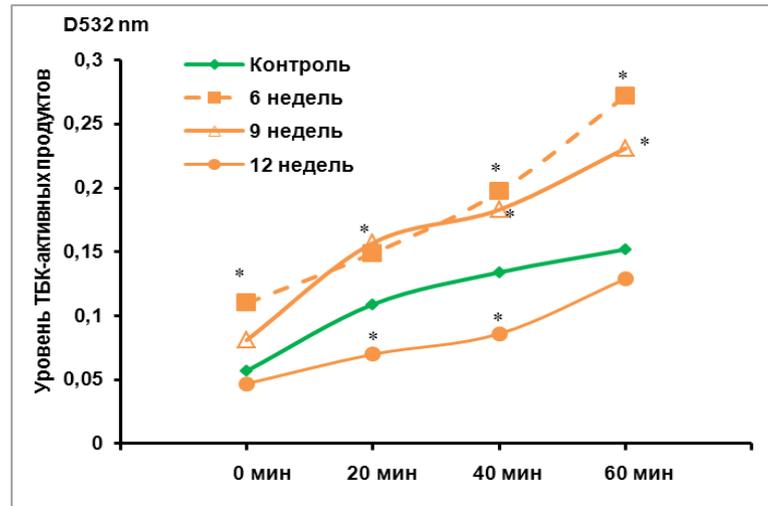


Рис. 11. Влияние субхронического действия фторида натрия на резистентность мембранных структур печени к индукции свободнорадикального окисления *in vitro* на поздних сроках

Примечание: D – оптическая плотность при 532 nm; 0 мин, 20 мин, 40 мин, 60 мин – время окисления, индуцированного *in vitro*; данные представлены в виде медианы.

Начиная с 6 недели происходило смещение прооксидантного и антиоксидантного равновесия в сторону активации свободнорадикальных процессов (табл. 9, рис. 11) – 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 хронического 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 хроническом действии вы-

соких 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 (табл. 10). 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 мембрано-связанной 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 (табл. 11) и на 12 неделе воздействия фторида натрия локусы фиброзных волокон. Однако проявляются и компенсаторные механизмы, в частности, в виде увеличения числа двуядерных гепатоцитов, что свидетельствуют об активации регенерация этого органа в условиях субхронического воздействия фторида натрия. При этом ведущую роль в регенерации печени при хроническом действии стрессорных факторов играют ДНК-синтетические процессы – пролиферация и полиплоидия гепатоцитов (Байдюк Е.В. с соавт., 2012).

Таблица 11.

**Гистопатологические изменения в печени крыс на поздних сроках
субхронического воздействия фторида натрия**

Повреждение органа	6 недель	9 недель	12 недель
Вакуольная дистрофия гепатоцитов	++	++	+++
Баллонная дистрофия гепатоцитов	++	++	+++
Полнокровие сосудов	+	+	+
Лимфоплазмочитарная инфильтрация портальных трактов	++	++	+++
Фибропластические изменения в портальных трактах	+	++	+++
Фокусы некрозов в портальных трактах долек печени	+	++	+++
Активация клеток Купфера	+	+	++

Примечание: + – слабовыраженные изменения; ++ – средневыраженные изменения; +++ – сильновыраженные изменения

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 ингибирование внутриклеточных защитных систем. На морфологическом уровне изменения в печени до 6 недели субхронического действия 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одной из важных проблем биологии и медицины является выяснение физиологических и молекулярных механизмов влияния внешней среды на организм, особенно при действии неблагоприятных повреждающих факторов, например, субхронического воздействия фторида натрия на организм. Многочисленные исследования в этой области подтверждают актуальность данной проблемы, в которой выделяют несколько основных направлений.

Одно из них связано с изучением роли свободнорадикального окисления и различных внутриклеточных защитных систем при действии фторида натрия. На различных экспериментальных моделях показано, что окислительный стресс является одним из механизмов цитотоксичности фтора (Коньк У.В. с соавт., 2001; Гаврилюк Л.А. с соавт., 2007; Wang Y.N. et al., 2000; Reddy G.V. et al., 2003; Garcia-Montalvo E.A. et al., 2009). Однако эти данные противоречивы и получены на моделях с высокими концентрациями фтора и при длительном их воздействии без учёта его ранних проявлений. Кроме того, свободнорадикальные процессы не только вызывают повреждения, но и участвуют в регуляции различных клеточных функций, таких как пролиферация, биосинтез гормонов, метаболизм, апоптоз и другие. Под действием многочисленных стимулов клетки образуют АФК, которые используют как мессенджеры для передачи сигнала к клеточному ядру. В результате этого происходит активация таких редокс-чувствительных элементов, как фактор транскрипции HIF-1 α , индуцирующий синтез различных белков с защитной и репарирующей функциями, в частности ферменты антиоксидантной защиты и белки семейства HSP. Изменения в экспрессии фактора транскрипции HIF-1 α и белков семейства HSP в ответ на субхроническое воздействие фторида натрия на организм практически не изучены.

Другое направление связано с тем, что начальные стадии фтористого воздействия имеют слабо выраженные клинические проявления. Изучению ранних проявлений действия фторида натрия на организм посвящено незначительное количество работ и практически единичны попытки выявить стадии развития фтористой интоксикации и критерии их определения. При этом важной задачей оста-

ётся изучение органоспецифических особенностей метаболических и функциональных изменений в ответ на субхроническое действие фторида натрия.

Поэтому в данной работе проведено комплексное изучение уровня свободнорадикального окисления, внутриклеточных защитных белков, активности ферментов основных метаболических путей и органоспецифические особенности их изменения при субхроническом воздействии фторида натрия.

Среди наиболее значимых механизмов действия неорганических соединений фтора на клетку выделяют изменение путей внутриклеточной сигнализации и ингибирующее влияние на процессы транскрипции и трансляции. Однако недавними исследованиями показана активация трансляции в различных тканях на начальных этапах фтористого воздействия. Так, был обнаружен синтез белков *de novo* – 21 в сердце, 28 в остеобластах, 13 в почках и 8 в печени (Xu H. et al., 2005; Xu H. et al., 2008; Lu J. et al., 2009; Pereira S. et al., 2013). Большая часть этих белков участвует в окислительном метаболизме и росте клеток, в механизмах апоптоза и развитии флюороза при длительном поступлении фтора в организм. В данной работе этот вопрос был исследован в отношении изменения уровня экспрессии фактора транскрипции, индуцируемого гипоксией – HIF-1 α и ряда белков срочного ответа с защитной функцией – индуцибельных HSP72 и HOx-1 и конститутивных форм – HSC73 и HOx-2 в сердце, лёгких и печени. Показано, что на ранних сроках действия фторида натрия (1-3 недели) в этих органах с разной скоростью и интенсивностью происходит увеличение уровня HIF-1 α , HSP72, HSC73, HOx-1 и HOx-2. Так, интенсивность синтеза защитных внутриклеточных систем в ответ на действие фторида натрия 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,

демонстрируя максимальную активацию защитных систем, характеризующих преимущественно гипоксическую компоненту воздействия фторида натрия в

отношении ткани печени. Напротив, стрессорная компонента вызывала наибольший ответ в ткани сердца. Ткань лёгких занимает промежуточное положение в обоих случаях. Причём, если обнаруженное на ранних сроках действия фторида натрия увеличение уровня внутриклеточных защитных систем в лёгких поддерживало устойчивость мембранных структур к индукции свободнорадикальных процессов на контрольном уровне, то в сердце и печени – повышало её. Уровень и соотношение защитных белков в тканях коррелирует с функциональным состоянием организма в целом – высокий уровень HIF-1 α , HSC73, HSP72, HOx-1 и HOx-2 сохранял на ранних сроках субхронического действия фторида натрия биохимический гомеостаз в клетках изученных органов.

Таким образом, несмотря на то, что в течение ранних сроков вплоть до 3-х недель действия фторида натрия активированы различные компоненты редокс-сигнальной системы, реализация компенсаторных механизмов зависит от значительной индукции этих защитных систем организма. Иными словами, регистрация роста уровня защитных систем может явиться прогностическим критерием, свидетельствующим об активации стрессорной и гипоксической компонент фактора повреждающей природы, пролонгация действия которого может привести в дальнейшем к срыву компенсаторной защиты организма и потребовать введения дополнительных профилактических и коррекционных процедур.

Действительно увеличение сроков действия фторида натрия больше 3 недель приводит к активации свободнорадикального окисления в организме, в результате чего нарушается ферментативная активность в тканях и запускаются патологические изменения в сердце, лёгких и печени. При этом максимальные повреждения характерны для печени.

Таким образом, на молекулярном уровне показано, что устойчивость организма к субхроническому воздействию фторида натрия определяется увеличением синтеза HIF-1 α , HSP72, HSC73, HOx1 и HOx-2 и поддержанием свободнорадикальных процессов на контрольном уровне. Поражающий и цитотоксический эффекты длительного действия неорганических соединений фтора обусловлены активацией свободнорадикального окисления и снижением активности системы

антиоксидантной защиты, а также нарушением энергетического метаболизма в клетках.

В целом, проведённое исследование позволило на основе комплексного изучения активации различных компонентов редокс-сигнальной системы в сердце, лёгких и печени расширить фундаментальные представления о молекулярных патогенетических механизмах субхронического воздействия фторида натрия. Полученные результаты имеют практическое значение для разработки эффективных способов органопротекторной профилактики и коррекции в зависимости от тканеспецифических особенностей и длительности действия фторида натрия.

Каковы дальнейшие перспективы развития направления представленной работы. Во-первых, это продолжение изучения индукции внутриклеточных защитных систем – NIF-1 α , HSP72, HSC73, HOx1 и HOx-2 в тканях разных органов на поздних сроках действия фторида натрия.

Во-вторых, на основе комплексного изучения механизмов индукции защитных систем и их участия в регуляции свободнорадикального окисления разработка и внедрение эффективных способов органопротекторной профилактики субхронического воздействия фторида натрия на организм.

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 (аспаратаминотрансфераза), 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 отли-

чие 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авцын, А.П. Патология флюороза / А.П.Авцын, А.А.Жаворонков; Отв. ред. В. П. Казначеев. – Новосибирск: Наука: Сиб. отд-ние, 1981. – 335 с.
2. Агалакова, Н.И. Влияние неорганических соединений фтора на живые организмы различного филогенетического уровня / Н.И. Агалакова, Г.П. Гусев // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2011. – Т.47, №5. – С.337-347.
3. Андреева, Л.И. Особенности внутриклеточного содержания и функциональная роль белков теплового шока семейства 70 кДа при стрессе и адаптации / Л.И. Андреева, А.А. Войкова, Б.А. Маргулис // Технологии живых систем. – 2009. – Т.6. №3. – С.11-17.
4. Анохина, Е.Б. Механизмы регуляции транскрипционного фактора HIF при гипоксии / Е.Б. Анохина, Л.Б. Буравкова // Биохимия. – 2010. – Т.75, Вып.2. – С.185-195.
5. Архипенко Ю.В., Диденко В.В., Сазонтова Т.Г., Меерсон Ф.З. Сравнительная оценка влияния иммобилизационного стресса на динамику устойчивости к индукции перекисного окисления липидов внутренних органов и головного мозга. // Докл. АН СССР. – 1989. – Т.304, №6. – С.1500-1503.
6. Архипенко, Ю.В. Стрессорные повреждения ионных насосов миокарда и их адаптационная защита: автореф. дис... д.б.н.: 14.00.16 – патологическая физиология; 03.00.02 - биофизика / Юрий Владимирович Архипенко. – Москва, 1992. – 43С.
7. Байдюк, Е.В. Клеточные механизмы регенерации печени крыс после экспериментального инфаркта миокарда / Е.В. Байдюк, О.В. Коршак, А.А. Карпов и др. // Цитология. – 2012. – Т.54, №12. – С.873-882.
8. Белкина, Л.М. Вариабельность сердечного ритма, уровень катехоламинов и устойчивость сердца к ишемическим и стрессорным повреждениям у крыс Вистар и Август / Л.М. Белкина, Т.Н. Кириллина, Е.В. Попкова, В.Л. Лакомкин // Нурохиа Мед. J. – 2004. – №6. – С.15-18.
9. Биленко, М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов / М.В. Биленко. – М.: Медицина, 1989. – 368с.

10. Болдырев, А.А. Роль активных форм кислорода в жизнедеятельности нейрона / А.А. Болдырев // Успехи физиол. наук. – 2003. – Т.34, №3. – С.21-34.
11. Владимиров, Ю.А. Нарушение барьерных свойств внутренней и наружной мембран митохондрий, некроз и апоптоз / Ю.А. Владимиров // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. – 2002. – Т.19, №5. – С.356-377.
12. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы в живых системах / Ю.А. Владимиров, О.А. Азизова, А.И. Деев и др. // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. – 1991. – Т.29. – 249 с.
13. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты / Ю.А. Владимиров // Вестник РАМН. – 1998. – №7. – С.43-51.
14. Волгина, Г.В. Паратиреоидный гормон – универсальный уремический токсин / Г.В. Волгина, Ю.В. Перепеченных // Нефрология и диализ. – 2000. – Т. 2, №1-2. – С.15-25.
15. Гаврилюк, Л.А. Влияние антиоксидантной терапии на активность глутатионзависимых энзимов слюны пациентов с флюорозом / Л.А. Гаврилюк, Е.А. Степко, Ю.Г. Спинеи и др. // Клин. лаб. диагностика. – 2007. – №1. – С.22-37.
16. Гвозденко, Т.А. Липиды крови крыс при моделировании электролитной нефропатии / Т.А. Гвозденко, Т.П. Новгородцева, Н.В. Жукова // Пат. физиол. – 2006. – №2. – С.24-25.
17. Гланц, С. Медико-биологическая статистика: Пер. с англ. / С. Гланц. – М: Практика, 1999. – 459 с.
18. Горожанская, Э. Г. Свободно-радикальное окисление и механизмы антиоксидантной защиты в нормальной клетке и при опухолевых заболеваниях (лекция) / Э. Г. Горожанская // Клин. лаб. диагностика. – 2010. – № 6. – С. 28–44.
19. Губский, Ю.И. Роль активных форм кислорода в функциональной активности MAP-киназного каскада, глобальных факторов транскрипции и развитии апоптоза (обзор литературы и собственных исследований) / Ю.И. Губский, И.Ф. Беленичев, Е.Л. Левицкий и др. // «Журн. АМН України». – 2008. – Т.14, № 2. – С.203-217.

20. Гужова, И.В. Механизмы работы шаперона Hsp70 в нормальных клетках и при клеточной патологии: дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.25 / Гужова Ирина Владимировна. – Санкт-Петербург, 2004. – 180 с.

21. Дубинина, Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса / Е.Е. Дубинина // Вопр. мед. хим. – 2001. – Т.47. №6. – С.561-581.

22. Дудченко, А.М. Триггерная роль энергетического обмена в каскаде функционально-метаболических нарушений при гипоксии/ А.М. Дудченко, Л.Д. Лукьянова // Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и клинические аспекты; Под ред. Лукьяновой Л.Д., Ушакова И.Б. – М., 2004. – С.51-83.

23. Евдонин, А.Л. Внеклеточный белок теплового шока 70 и его функции / А.Л. Евдонин, Н.В. Медведева // Цитология. – 2009. – Т.51, №2. – С.130-137.

24. Еропкин, М.Ю. Механизмы и модели исследования токсичности на клеточном уровне / М.Ю. Еропкин // Прикладная токсикология. – 2010. – Т.1, №2. – С.30-49.

25. Жукова, А.Г. Молекулярные механизмы адаптации к изменению уровня кислорода (Роль свободнорадикального окисления) / А.Г. Жукова. — Palmarium academic publishing. – 2012. – 196 с.

26. Жукова, А.Г. Специфичность клеточного ответа на действие различных производственных токсикантов/ А.Г. Жукова, Е.В. Уланова, Д.В. Фоменко и др. // Медицина труда и промышленная экология. – 2011. – №7. – С.23-26.

27. Жукова, А.Г. Тканеспецифичность ответа системы про- и антиоксидантов после реанимации / А.Г. Жукова, Т.Г. Сазонтова, Ю.В. Заржецкий и др. // Общая реаниматология. – 2005. Т.1, №3. – С.46-53.

28. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Ткачёв В.О. Некоторые принципы и механизмы редокс-регуляции // Кислород и антиоксиданты. – 2009. – №1. – С.3-64.

29. Измеров, Н.Ф. Современные аспекты сохранения и укрепления здоровья работников, занятых на предприятиях по производству алюминия / Н.Ф. Измеров, И.В. Бухтияров, Л.В. Прокопенко и др. // Медицина труда и промышленная экология. – 2012. – №11. – С.1-7.

30. Казарина, Л.Н. Медицинские аспекты комплексной профилактики и лечения флюороза у детей, проживающих в эндемичном районе / Л.Н.Казарина, А.Н.Самаркина, А.Е.Пурсанова // Медицинский альманах. – 2015.-№ 3 (38). – С. 172-175
31. Калетина, Н.И. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсиантов: Учебное пособие для вузов. / Н.И.Калетина – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 1016 с.
32. Кирьяков, В.А. Изучение окислительного метаболизма в профпатологии (обзор литературы) / В.А. Кирьяков, Н.А. Павловская, Л.М. Сааркоппель и др. // Медицина труда и промышленная экология. – 2004. – №4. – С.22-26.
33. Клебанов, Г.И. Клеточные механизмы прайминга и активации фагоцитов / Г.И. Клебанов, Ю.А. Владимиров // Успехи современной биологии. – 1999. – Т.119, №5. – С. 462-475.
34. Конык, У.В. Особенности кислородзависимого метаболизма у животных с хронической фтористой интоксикацией в условиях гипокситерапии / У.В. Конык, М.Р. Гжегоцкий, Е.А. Коваленко и др. // Нурохиа Мед. J. – 2001. – Т.9. №1-2. – С.6-8.
35. Крутецкая, З.И. Механизмы внутриклеточной сигнализации / З.И. Крутецкая, О.Е. Лебедев, Л.С. Курилова. – Санкт-Петербург, 2003. – 208с.
36. Кузьмина, Л.П. Роль аденилатциклазной системы в патогенезе различных форм профессиональной бронхиальной астмы / Л.П. Кузьмина, Т.Ю. Стасенкова, В.А. Стесикова и др. // Медицина труда и промышленная экология. – 2004. – №6. – С.17-22.
37. Кулинский, В.И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита / В.И. Кулинский // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – №1. – С.2-7.
38. Кулинский, В.И. Биологическая роль глутатиона / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Успехи современной биологии. – 1990. – Т.1. №4. – С.20-33.

39. Кулкыбаев, Г.А. Современные проблемы профессиональной патологии / Г.А. Кулкыбаев // Медицина труда и промышленная экология. – 2006. – №4. – С.1-7.

40. Лабас, Ю.А. Регуляторная роль активных форм кислорода: от бактерий до человека / Ю.А. Лабас, А.В. Гордеева, Ю.И. Дерябина и др. // Успехи современной биологии. – 2010. – Т.130, № 4. – С.323-335.

41. Ланкин В.З. Концентрационная инверсия антиоксидантного и прооксидантного действия β -каротина в тканях *in vivo* / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, Г.Г. Коновалова и др. // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1999. – Т.128, №9. – С.314-318.

42. Левицкий, А.П. Профилактическое действие растительных адаптогенов и цитрата кальция при фтористой интоксикации / А.П. Левицкий, О.А. Макаренко, В.Н. Гороховский // Современные проблемы токсикологии. – 2008. – №1. – С.65-68.

43. Лукьянова, Л.Д. Сигнальная функция митохондрий при гипоксии и адаптации / Л.Д. Лукьянова // Патогенез. – 2008. – №3. – С.4-12.

44. Мацкевич, А.А. Роль цитоплазматических факторов в стабилизации Ca^{2+} -транспортирующей функции саркоплазматического ретикулума миокарда крысы при адаптации к стрессу / А.А. Мацкевич, Т.Г. Сазонтова // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1999. – Т.127, №2. – С.155-159.

45. Меньщикова, Е.Б. Свойства и функции НАДФН-оксидаз клеток млекопитающих / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков // Успехи современной биологии. – 2006. – Т. 126, №1. – С.97-112.

46. Михайлова, Н.Н. Экспериментальный поиск иммунологических критериев определения стадий развития хронической фтористой интоксикации / Н.Н. Михайлова, А.С. Казицкая, Л.Г. Горохова и др. // Медицина труда и промышленная экология. – 2012. – №11. – С.32-37.

47. Михайлова, Н.Н. Особенности внутриклеточных защитных механизмов при действии на организм различных ксенобиотиков / Н.Н. Михайлова, Т.Г. Сазонтова, Д.А. Алехина и др. // Цитокины и воспаление. – 2013. – Выпуск 4. – С.71-76.

48. Могильницкая, Л.В. Влияние гипоксии на состояние мембран и перекисное окисление липидов в легких и крови крыс / Л.В. Могильницкая, В.Н. Прокофьев, А. Фан и др. // Вопросы мед. хим. – 1993. – Т.39. №6. – С.34-36.

49. Мусийчук, Ю.И. Фтор и его соединения: Серия «Токсикология для врачей» / Ю.И. Мусийчук, А.Н. Гребенюк, А.Ю. Широков. – СПб: ООО «Издательство ФОЛИАНТ», 2012. – 104 с.

50. Мухамеджанов, Р.Ш. Функциональное состояние сердца у работников алюминиевого производства с хронической фтористой интоксикацией: автореф. дис...к.м.н.: 03.00.13 – физиология; 14.00.16 – патологическая физиология / Р.Ш. Мухамеджанов. – Томск, 2004. – 22 с.

51. Нельсон, Д. Основы биохимии Ленинджера: в 3 т. Т.2: Биоэнергетика и метаболизм / Д.Нельсон, М. Кокс; пер. с англ.—М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. – 636с.

52. Нестеров, Ю.В. Структурные преобразования лёгочной ткани и свободнорадикальные процессы при гипоксическом и гипероксическом воздействиях на разных этапах постнатального онтогенеза / Ю.В. Нестеров, И.В. Туреченко // Естественные науки. – 2012. – №3 (40). – С.149-155.

53. Оковитый, С.В. Клиническая фармакология антигипоксантов (часть I) / С.В. Оковитый // ФАРМ-индекс-Практик. – 2004. – Вып.6. – С.30-39.

54. Октябрьский, О.Н. Редокс-регуляция клеточных функций / О.Н. Октябрьский, Г.В. Смирнова // Биохимия. – 2007. – Т.72, Вып.2. – С.158-174.

55. Окунев, В.Н. Патогенез, профилактика и лечение фтористой интоксикации / В.Н. Окунев, В.И. Смоляр, Л.Ф. Лаврушенко. – Киев, 1987. – 152 с.

56. Платонов, А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы / А.Е. Платонов. – М: Изд-во РАМН, 2000. – 51 с.

57. Плахотник, В.Н. Фториды вокруг нас / В.Н. Плахотник // Соросовский образовательный журнал – 1998. - №2. – С.95-100.

58. Пшенникова, М.Г. Феномен стресса. Эмоциональный стресс и его роль в патологии / М.Г. Пшенникова // В кн.: Актуальные проблемы патофизиологии. – М.: Медицина. – 2001. – С. 227-228.
59. Разумов, В.В. Флюороз как проявление преждевременного старения и атавистического остеогенеза / В.В. Разумов. – Новокузнецк. – 2003. – 120 с.
60. Разумов, В.В. Хроническая фтористая интоксикация как патология соединительной ткани с исходом в преждевременное старение (аналитический обзор) / В.В. Разумов // Медицина труда и промышленная экология. – 1997. – №11 – С.22-27.
61. Рослая, Н.А. Клинико-патогенетические особенности хронической профессиональной интоксикации соединениями фтора в современных условиях / Н.А. Рослая, Е.И. Лихачева, И.Е. Оранский и др. // Медицина труда и промышленная экология. – 2012. – №11. – С.17-22.
62. Рослый, И.М. Гипотеза: адаптивное значение ферментемии / И.М. Рослый, С.В. Абрамов // Патол. физиол. – 2003. – № 4. – С. 5-9.
63. Рослый, И.М. Биохимические показатели плазмы крови при различных клинических состояниях/ И.М.Рослый, С.В.Абрамов, М.Г.Водолажская //Врач. – 2006. – №4. – С.6-11
64. Рослый, И.М. Правила чтения биохимического анализа: Руководство для врача / И.М. Рослый, М.Г. Водолажская. – М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агенство», 2010. – 96с.
65. Сазонтова, Т.Г. Закономерности модуляции антиоксидантного статуса клетки в ответ на активацию свободнорадикального окисления / Т.Г. Сазонова // Нурохіа Med. J. – 2002. – №1-2. – С.2-9.
66. Сазонтова, Т.Г. Значение баланса прооксидантов и антиоксидантов – равнозначных участников метаболизма / Т.Г. Сазонтова, Ю.В. Архипенко // Патол. физиол. – 2007. – №1. – С.2-18.
67. Сазонтова, Т.Г. Роль активных форм кислорода и редокс-сигнализации в защитных эффектах адаптации к изменению уровня кислорода // Т.Г. Сазонтова,

Н.А. Анчишкина, А.Г. Жукова и др. // Фізіологічний журнал. – 2008. – №3. – С.18-32.

68. Сазонтова, Т.Г. Ca^{2+} -транспорт в саркоплазматический ретикулум и белки срочного ответа в миокарде крыс при реанимации после остановки системного кровообращения / Т.Г. Сазонтова, А.Г. Жукова, Ю.В. Заржецкий и др. // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2005. – Т.140, №7. – С.52-56.

69. Сазонтова, Т.Г. Сократительная функция сердца и антиоксидантная система в миокарде у крыс линий Август и Вистар при ишемии и реперфузии / Т.Г. Сазонтова, Л.М. Белкина, А.Г. Жукова и др. // Фізіологічний журнал. – 2004. – Т.50. №3. – С.9-15.

70. Сазонтова, Т.Г. Фактор транскрипции NIF-1 α , белки срочного ответа и резистентность мембранных структур в динамике после острой гипоксии / Т.Г. Сазонтова, А.Г. Жукова, Н.А. Анчишкина и др. // Вестник РАМН. – 2007. – №2. – С. 17-25.

71. Силуянова, С.Н. Печень. Обезвреживание токсических веществ / С.Н. Силуянова, Л.Е. Андрианова, С.А. Лесничук // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. – 2002. – №3. – С.50-56.

72. Соодаева, С.К. Свободнорадикальные механизмы повреждения при болезнях органов дыхания / С.К. Соодаева // Пульмонология. – 2012. – №1. – С.5-10.

73. Софронова, Е.В. Современные представления о роли нейрогуморальной и аденилатциклазной систем при профессиональных аллергических заболеваниях кожи / Е.В. Софронова, Л.П. Кузьмина // Медицина труда и промышленная экология. – 2007. – №2. – С.21-28.

74. Строчкова, Л.С. Влияние соединений фтора на ферменты клетки / Л.С. Строчкова, В.И. Сороковой // Успехи современной биологии. – 1983. – Вып. 2. – С.211-223.

75. Титов, В.Н. Антиокислительная активность плазмы крови – тест нарушения биологических функций эндоэкологии, экзотрофии и реакции воспаления / В.Н. Титов, В.В. Крылин, В.А. Дмитриев и др. // Клин. лаб. диагностика. – 2010. – №7.

76. Тихонова, Н.С. Молекулярный шаперон HSP70 защищает клетки нейробластомы SK-N-SH от гипоксического стресса / Н.С. Тихонова, О.С. Москалева, Б.А. Мангулис и др. // Цитология. – 2008. – Т.50, №5. – С.467-472.
77. Токарь, В.И. Фтор и эндокринная система / В.И. Токарь, А.А. Жаворонков, С.В. Щербаков. – Новосибирск: Наука, 1991. – 194с.
78. Турпаев, К.Т. Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов / К.Т. Турпаев // Биохимия. – 2002. – Т.67. – С.339-352.
79. Уланова, Е.В. Применение нутрицевтиков в качестве профилактики профессионального флюороза / Уланова Е.В., Анохина А.С., Данилов И.П. и др. // Медицина труда и промышленная экология. – 2006. – №6. – С.44-48.
80. Филимонов, С.Н. Ишемическая болезнь сердца и её факторы риска у рабочих с профессиональным флюорозом / С.Н. Филимонов, М.В. Лукьянова, В.В. Разумов и др. // Здоровье работающих: клинические аспекты профессиональной патологии (Материалы XXXIX научно-практической конференции). – Новокузнецк, 2004. – С.153-164.
81. Фокина, Е.Г. Энзимологическая часть биохимического паспорта человека / Е.Г. Фокина, И.М. Рослый // Медицинский алфавит. Эпидемиология и гигиена. – 2013. – №4. – С.34-36.
82. Хоменко, И.П. Роль белков теплового шока HSP70 и HSP32 в защитном эффекте адаптации культуры клеток гиппокампа HT22 к окислительному стрессу / И.П. Хоменко, Л.Ю. Бахтина, О.М. Зеленина и др. // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2007. – №8. – С.138-142.
83. Хочачка, П. Биохимическая адаптация / П. Хочачка, Дж. Сомеро. – М.: Мир. – 1988. – 568 с.
84. Чумаков, П.М. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме / П. М. Чумаков // Успехи биологической химии. – 2007. – №47. – С.3–52.
85. Шалина, Т.И. Общие вопросы токсического действия фтора / Т.И. Шалина, Л.С. Васильева // Сибирский медицинский журнал. – 2009. – №5. – С.5-9.

86. Adachi, H. Endothelial scavenger receptors / H. Adachi, M. Tsujimoto // *Prog. Lipid Res.* – 2006. – Vol.45. – P. 379–404.
87. Adamek, E. In vitro and in vivo effects of fluoride ions on enzyme activity / E. Adamek, K. Pawiowska-Gyral, K. Bober // *Ann. Acad. Med. Stetin.* – 2005. – Vol.51 (2). – P.69-85.
88. Agalakova, N. I. Fluoride-induced death of rat erythrocytes in vitro / N.I. Agalakova, G.P. Gusev // *Toxicology In Vitro* – 2011. – Vol. 25. – P.1609-1618.
89. Anuradha, C.D. Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL-60 cells. *Free Radic* / C.D. Anuradha, S. Kanno, S. Hirano // *Biol. Med.* – 2001. – Vol.31 (3). – P.367-373.
90. Arispe, N. Hsc70 and Hsp70 interact with phosphatidylserine on the surface of PC12 cells resulting in a decrease of viability / N. Arispe, M. Doh, O. Simakova (et al.) // *FASEB J.* – 2004. – Vol.18 (14). – P.1636-1645.
91. Asea, A. HSP70 peptide-bearing and peptide-negative preparations act as chaperokines / A. Asea, E. Kabingu, M.A. Stevenson (et al.) // *Cell Stress & Chaperones.* – 2000. – Vol.5. – P.425-431.
92. Asea, A. Hsp70 stimulated cytokine production through a CD14-dependent pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine / A. Asea, S.A. Kraef, E.A. Kurt-Jones (et al.) // *Nat. Med.* – 2000. – Vol.6. – P558-569.
93. Asea, A. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70. Role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 / A. Asea, M. Rehli, E. Kabingu (et al.) // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P.15028-15034.
94. Aydin, G. Histopathological and biochemical changes in lung tissues of rats following administration of fluoride over several generations / G. Aydin, E. Cicek, M. Akdogan (et al.) // *J. Appl. Toxicol.* – 2003. – Vol.23, №6. – P.437-446.
95. Barbier, O. Molecular mechanisms of fluoride toxicity / O. Barbier, L. Arreola-Mendoza, L.M. Del Razo // *Chemico-Biological Interactions.* – 2010. – Vol.188. – P.319-333.
96. Barreto, A. Stress-induced release of Hsc70 from human tumors / A. Barreto, J.M. Gonzalez, E. Kabingu (et al.) // *Cell. Immunol.* – 2003. – Vol.222. – P.97-104.

97. Basha, M.P. Chronic fluoride toxicity and myocardial damage: antioxidant offered protection in second generation rats / M.P. Basha, N.S. Sujitha // *Toxicol. Int.* – 2011. – Vol.18, №2. – P.99-104.
98. Bauer, M. Heme oxygenase-1: redox regulation and role in the hepatic response to oxidative stress / M. Bauer, I. Bauer // *Antioxid. Redox Signal.* – 2002. – Vol.4. №5. – P.749-758.
99. Bergandi, L. Fluoride-containing bioactive glasses inhibit pentose phosphate oxidative pathway and glucose 6-phosphate dehydrogenase activity in human osteoblasts / L. Bergandi, V. Aina, S. Garetto (et al.) // *Chem Biol Interact.* – 2010. – Vol.183 (3) – P.405-415.
100. Bigay, J. Fluoride complexes of aluminium or beryllium act on G-proteins as reversibly bound analogues of the gamma phosphate of GTP / J. Bigay, P. Deterre, C. Pfister (et al.) // *EMBO J.* – 1987. – Vol.6 (10). – P.2907-2913.
101. Bilton, R.L. The subtle side to hypoxia inducible factor (HIF α) regulation / R.L. Bilton, G.W. Booker // *Eur. J. Biochem.* – 2003. – Vol.270. – P.791-798.
102. Borke, J.L. Chronic fluoride ingestion decreases ⁴⁵Ca uptake by rat kidney membranes / J.L. Borke, G.M. Whitford // *J. Nutr.* – 1999. – Vol.129. – P.1209-1213.
103. Calabrese, J.R. Rash in multicenter trials of lamotrigine in mood disorders: Clinical relevance and management / J.R. Calabrese, J.R. Sullivan, C.L. Bowden // *J. Clin. Psych.* – 2002. – №63. – P.1012-1019.
104. Campisi, J. Role of extracellular HSP72 in acute stress-induced potentiation of innate immunity in active rats / J. Campisi, M. Fleshner // *J. Appl. Physiol.* – 2003. – №94. – P.43-52.
105. Chandel, N.S. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight / N.S. Chandel, P.T. Schumacker // *J. Appl. Physiol.* – 2000. – Vol.88, №5 – P.1880-1889.
106. Chattopadhyay, A. Fluoride-induced histopathology and synthesis of stress protein in liver and kidney of mice / A. Chattopadhyay, S. Podder, S. Agarwal (et al.) // *Arch Toxicol.* – 2010. – Vol.85 (4). – P.327-335.

107. Chen, Q. Selenium increases expression of HSP70 and antioxidant enzymes to lesser oxidative damage in fincoal-type fluorosis / Q. Chen, Z. Wang, Y. Xiong (et al.) // *J. Toxicol. Sci.* – 2009. – Vol.34. – P.399-405.
108. Chlubek, D. Activity of pancreatic antioxidative enzymes and malondialdehyde concentrations in rats with hyperglycemia caused by fluoride intoxication / D. Chlubek, E. Grucka-Mamczar, E. Birkner (et al.) // *J. Trace Elem. Med. Biol.* – 2003. – №17. – P.57–60.
109. Chouhan, S. Fluoride-induced changes in haem biosynthesis pathway, neurological variables and tissue histopathology of rats / S. Chouhan, V. Lomash, S.J.S. Flora // *J. Appl. Toxicol.* – 2010. – №30. – P.63-73.
110. Cicek, E. Effects of chronic ingestion of sodium fluoride on myocardium in a second generation of rats / E. Cicek, G. Aydin, M. Akdogan (et al.) // *Hum. Exp. Toxicol.* – 2005. – №24. – P.79-87.
111. Colombrita, C. Regional rat brain distribution of heme oxygenase-1 and manganese superoxide dismutase mRNA: relevance of redox homeostasis in the aging processes / C. Colombrita, V. Calabrese, A.M. Stella (et al.) // *Exp. Biol. Med.* – 2003. – Vol.228. №5. – P.517-524.
112. Cornelussen, R.N.M. Heme-oxygenase-1: versatile sentinel against injury/ R.N.M. Cornelussen, A.A. Knowlton // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2002. – Vol.34. – P.1297-1300.
113. Dabrowska, E. Histoenzymatic study of the liver and submandibular gland of rats exposed to sodium fluoride in drinking water / E. Dabrowska, M. Balunowska, R. Letko // *Ann. Acad. Med. Stetin.* – 2006. – Vol.52, №1. – P.9-15.
114. Davies, A.S. Organellar calcium signalling mechanisms in *Drosophila* epithelial function / A.S. Davies, S. Terhzaz // *J. Exp. Biol.* – 2009. – Vol.212. – P.387-400.
115. Dennery, P.A. Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in neonatal Gunn rats exposed to hyperoxia / P.A. Dennery, A.F. McDonagh, D.R. Spitz (et al.) // *Free Radic Biol Med.* – 1995. – Vol.19 (4). –P.395-404.

116. Dennery, P.A. Ontogeny and developmental regulation of heme oxygenase / P.A. Dennery, P.A. Rodgers // *J. Perinatol.* – 1996. – Vol.3 (Pt 2). – P.79-83.
117. Dery, M.A. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators / M.A. Dery, M.D. Michaud, D.E. Richard // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2005. – Vol.37, №3. – P.535-540.
118. Dominguez, J.H. Fluoride mobilizes intracellular calcium and promotes Ca²⁺ influx in rat proximal tubules / J.H. Dominguez, J.G. Garcia, J.K. Rothrock (et al.) // *Am. J. Physiol.* – 1991. – Vol.26. – P.318-327.
119. Efremova, S.M. Heat shock protein Hsp70 expression and DNA damage in Baikalian sponges exposed to model pollutants and wastewater from Baikalsk Pulp and Paper Plant / S.M. Efremova, B.A. Margulis, I.V. Guzhova (et al.) // *Aquat Toxicol.* – 2002. – Vol.57, №4. – P.267-280.
120. Eriksson, A.M. Is the cytosolic catalase induced by peroxisome proliferators in mouse liver on its way to the peroxisomes? / A.M. Eriksson, B. Lundgren, K. Andersson (et al.) // *FEBS Lett.* – 1992. – Vol.308. – P.211-214.
121. Evdonin, A.L. Extracellular heat shock protein 70 mediates heat stress-induced epidermal growth factor receptor transactivation in A431 carcinoma cells / A.L. Evdonin, I.V. Guzhova, B.A. Margulis (et al.) // *FEBS Lett.* – 2006. – Vol.580. – P.6674-6678.
122. Ewing, J.F. Induction of heart heme oxygenase-1 (HSP32) by hyperthermia: possible role in stress-mediated elevation of cyclic 3'5'-Guanosine monophosphate / J.F. Ewing, V.S. Raju, M.D. Maines // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1994. – Vol.271. – P.408-414.
123. Fedele, A.O. Regulation of Gene Expression by the Hypoxia Inducible Factors / A.O. Fedele, L.W. Murray, D.J. Peet // *Molecular Interventions.* – 2002. – Vol.2. – P.229-243.
124. Fleshner, M. Cat exposure induces both intra- and extracellular Hsp72: the role of adrenal hormones / M. Fleshner, J. Campisi, L. Amiri (et al.) // *Psychoneuroendocrinology.* – 2004. – Vol.29. – P.1142-1152.

125. Flora, S.J. Co-exposure to arsenic and fluoride on oxidative stress, glutathione linked enzymes, biogenic amines and DNA damage in mouse brain / S.J. Flora, M. Mittal, D. Mishra // *J. Neurol. Sci.* – 2009. – Vol.285. – P.198-205.

126. Flora, S.J. Co-exposure to arsenic and fluoride on oxidative stress, glutathione linked enzymes, biogenic amines and DNA damage in mouse brain / S.J. Flora, M. Mittal, D. Mishra // *J. Neurol. Sci.* – 2009. – Vol.285. – P.198-205.

127. Fridovich, I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? / I. Fridovich // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1999. – Vol.893. – P.13-18.

128. Fridovich, I. Superoxide dismutase / I. Fridovich // *Accounts Chem. Res.* – 1972. – Vol.5. – P.321-326.

129. Fridovich, I. Superoxide radical and superoxide dismutases / I. Fridovich // *Annu. Rev. Biochem.* – 1995. – Vol.64. – P.97-112.

130. Frydman, J. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones / J. Frydman // *Ann. Rev. Biochem.* – 2001. – Vol.70. – P.603-664.

131. Ganter, M.T. Extracellular heat shock protein 72 is a marker of the stress protein response in acute lung injury / M.T. Ganter, L.B. Ware, M. Howard (et al.) // *Amer. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* – 2006. – Vol. 291. – P.354-361.

132. Garcia, J.G. Sodium fluoride induces phosphoinositide hydrolysis, Ca²⁺ mobilization, and prostacyclin synthesis in cultured human endothelium: further evidence for regulation by a pertussis toxin-insensitive guanine nucleotide-binding protein / J.G. Garcia, J. Dominguez, D. English // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* – 1991. – Vol.5, №2. – P.113-124.

133. García-Montalvo, E.A. Fluoride exposure impairs glucose tolerance via decreased insulin expression and oxidative stress / E.A. García-Montalvo, H. Reyes-Pérez, L.M. Del Razo // *Toxicology.* – 2009. – Vol.263. – P.75-83.

134. Gastpar, R. Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells / R. Gastpar, M. Gehrman, M.A. Bausero (et al.) // *Cancer Res.* – 2005. – Vol.65. – P.5238-5247.

135. Gehrman, M. Dual function of membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70), Bag-4, and Hsp40 protection against radiation-induced effects and target struc-

ture for natural killer cells / M. Gehrman, J. Marienhagen, H. Eichholtz-Wirth (et al.) // *Cell Death Differ.* – 2005. – №.12. – P.38-51.

136. Ghosh, J. Cytoprotective effect of arjunolic acid in response to sodium fluoride mediated oxidative stress and cell death via necrotic pathway / J. Ghosh, J. Das, P. Manna (et al.) // *Toxicol In Vitro.* – 2008. – Vol.22, №8. – P.1918-1926.

137. Gross, C. Cell surface-bound heat shock protein 70 (Hsp70) mediates perforin-independent apoptosis by specific binding and uptake of granzyme B / C. Gross, W. Koelch, A. DeMaio (et al.) // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol.278, №41. – P.41173-41181.

138. Gu, Y.Z. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals / Y.Z. Gu, J.B. Hogenesch, C.A. Bradfield // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2000. – Vol.40. – P. 519-561.

139. Guan, Z.Z. Changed cellular membrane lipid composition and lipid peroxidation of kidney in rats with chronic fluorosis / Z.Z. Guan, K.Q. Xiao, X.Y. Zeng (et al.) // *Arch. Toxicol.* – 2000. – Vol.74. №10. – P.602-608.

140. Guo, S. Heat shock protein 70 regulates cellular redox status by modulating glutathione-related enzyme activities / S. Guo, W. Wharton, P. Moseley (et al.) // *Cell Stress and Chaperones.* – 2007. – Vol.12, №3. – P.245-254.

141. Guo, X.Y. Oxidative stress from fluoride-induced hepatotoxicity in rats / X.Y. Guo, G.F. Sun, Y.S. Shenyang // *Fluoride.* – 2003. – Vol.36. – P.25-29.

142. Gutiérrez-Salinas, J. Exposure to sodium fluoride produces signs of apoptosis in rat leukocytes / J. Gutiérrez-Salinas, J.A. Morales-González, E. Madrigal-Santillán (et al.) // *Int J Mol Sci.* – 2010. – Vol.11, №9. – P.3610-3622.

143. Guzhova, I.V. HSP70 chaperone as a survival factor in cell pathology / I.V. Guzhova, B. Margulis // *International Review of Cytology.* – 2006. – Vol.254. – P.101-149.

144. Hai-lian, Ji Huanjing yu jiankang. Zazhi / Ji Hai-lian, Xiang Zhen. // *J. Environ. and Health.* -2002. -Vol. 19. № 3. -C.216-217.

145. Han, F. Hypoxemia induces expression of heme oxygenase-1 and heme oxygenase-2 proteins in the mouse myocardium / F. Han, K. Takeda, M. Ono, F. Date, K.

Ishikawa, S. Yokoyama, Y. Shinozawa, K. Furuyama, S. Shibahara // *J. Biochem.* – 2010. – Vol.147 (1). – P.143-151.

146. Harada, Y. Complex formation of 70-kDa heat shock protein with acidic glycolipids and phospholipids / Y. Harada, C. Sato, K. Kitajima // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – Vol.353. – P.655-660.

147. Hassan, H.A. Mitigating effects of antioxidant properties of black berry juice on sodium fluoride induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats / H.A. Hassan, M.I. Yousef // *Food and Chemical Toxicology.* – 2009. – Vol.47. – P.2332-2337.

148. Hoppeler, H. Response of skeletal muscle mitochondria to hypoxia / H. Hoppeler, M. Vogt, E.R. Weibel (et al.) // *Exp. Physiol.* – 2003. – Vol.88, №1. – P.109-119.

149. Ibuki, Y. Low-dose irradiation induces expression of heat shock protein 70 mRNA and thermo- and radio-resistance in myeloid leukemia cell line / Y. Ibuki, A. Hayashi, A. Suzuki (et al.) // *Biol Pharm Bull.* – 1998. – Vol.21. №5. – P.434-439.

150. Ikner, A. Yeast signaling pathways in the oxidative stress response / A. Ikner, K. Shiozaki // *Mutat. Res.* – 2005. – Vol.569, №1-2. – P.13-27.

151. Izquierdo-Vega, J.A. Decreased in vitro fertility in male rats exposed to fluoride-induced oxidative stress damage and mitochondrial transmembrane potential loss / J.A. Izquierdo-Vega, M. Sánchez-Gutiérrez, L.M. Del Razo // *Toxicology and Applied Pharmacology.* – 2008. – Vol.230. – P.352-357.

152. Karube, H. NaF activates MAPKs and induces apoptosis in odontoblast-like cells / H. Karube, G. Nishitai, K. Inageda (et al.) // *J Dent Res.* – 2009. – Vol.88, №5. – P.461-465.

153. Katschinski, D.M Interaction of the PAS B domain with HSP90 accelerates hypoxia-inducible factor-1 α stabilization / D.M. Katschinski, L. Le, S.G. Schindler (et al.) // *Cell Physiol. Biochem.* – 2004. – Vol.14. – P.351-360.

154. Ke, Q. Hypoxia-Inducible factor-1 (HIF-1) / Q. Ke, M. Costa // *Mol. Pharmacol.* – 2006. – Vol.70, №5. – P.1469-1480.

155. Khandare, A.L. Beneficial effect of copper supplementation on deposition of fluoride in bone in fluoride- and molybdenum-fed rabbits / A.L. Khandare, P. Suresh, P.U. Kumar (et al.) // *Calcif. Tissue Int.* – 2005. – Vol.77, №4. – P.233-238.

156. Kikugava, K. Interpretation of the thiobarbituric acid reactivity of rat liver and brain homogenates in the presence of ferric ion and ethylenediaminetetraacetic acid / K. Kikugawa, T. Kojima, S. Yamaki (et al.) // *Analyt.Biochem.* – 1992. – Vol.202. – P.249-255.

157. Kimura, F. Circulating heat-shock protein 70 is associated with postoperative infection and organ dysfunction after liver resection / F. Kimura, H. Itoh, S. Ambiru (et al.) // *Amer. J. Surg.* – 2004. – Vol.187. – P.777-784.

158. Kola, B. Expanding role of AMPK in endocrinology / B. Kola, M. Boscaro, G.A. Grossman (et al.) // *Trends Endocrinol. Metab.* – 2006. – Vol.17. – P.205-215.

159. Koroglu, B.K. Serum Parathyroid Hormone Levels in Chronic Endemic Fluorosis / B.K. Koroglu, I.H. Ersoy, M. Koroglu (et al.) // *Biol. Trace Elem. Res.* – 2011. – Vol.143 (1). – P.79-86.

160. Lancaster, G.I. Exosome-dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins / G.I. Lancaster, M.A. Febbraio // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol.280. – P.23345-23355.

161. Lee, J.H. Cooperative roles of c-Abl and Cdk5 in regulation of p53 in response to oxidative stress / J.H. Lee, M.W. Jeong, W. Kim (et al.) // *J Biol Chem.* – 2008. – Vol.283 (28). – P.19826-19835.

162. Lee, S.W. Expression of heat shock proteins and cytokines in response to ethanol induced damage in the small intestine of icr mice / S.W. Lee, D.W. Choi, S.C. Park (et al.) // *Intest Res.* – 2014. – Vol.12 (3). – P.205-213.

163. Li, D. Expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptors during ischemia-reperfusion and its role in determination of apoptosis and left ventricular dysfunction / D. Li, V. Williams, L. Liu (et al.) // *J. Amer. Coll. Cardiol.* – 2003. – Vol.41. – P.1048-1055.

164. Li, D. Upregulation of endothelial receptor for oxidized LDL (LOX-1) by oxidized LDL and implications in apoptosis of human coronary artery endothelial cells:

evidence from use of antisense LOX-1 mRNA and chemical inhibitors / D. Li, J.L. Mehta // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2000. – Vol.20. – P.1116-1122.

165. Li, L. The biochemistry and physiology of metallic fluoride: action, mechanism, and implications / L. Li // *Crit Rev Oral Biol Med.* – 2003. – Vol.14, №2. – P.100-114.

166. Liu, G. Fluoride causing abnormally elevated serum nitric oxide levels in chicks / G. Liu, C. Chai, L. Cui // *Environmental Toxicology and Pharmacology.* – 2003. – Vol.13. – P.199–204.

167. Lu, J. Comparative proteomics analysis of cardiac muscle samples from pufferfish *Takifugu rubripes* exposed to excessive fluoride: initial molecular response to fluorosis / J. Lu, Q. Xu, H. Liu (et al.) // *Toxicology Mechanisms and Methods.* – 2009. – Vol.19. – P.468-475.

168. Luck, H. Catalase / H. Luck // In: Bergmeyer H.U. (ed): *Methods of enzymatic analysis*, New York, Verlag-Chemie Academic Press. 1963. P.885-888.

169. Maines, M.D. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase: only one molecular species of the enzyme is inducible / M.D. Maines, G.M. Trakshel, R.K. Kutty // *J. Biol. Chem.* – 1986. – Vol.261. – P.411-419.

170. Maines, M.D. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms and clinical applications / M.D. Maines // *FASEB J.* – 1988. – Vol.2. – P.2557-2568.

171. Maines, M.D. The heme oxygenase system and its functions in the brain / M.D. Maines // *Cell. Mol. Biol.* – 2000. – Vol.46. №3. – P.573-585.

172. Maines, M.D. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases / M.D. Maines // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 1997. – Vol.37. – P.517-554.

173. Mambula, S.S. Heat shock protein 70 is secreted from tumor cells by a non-classical pathway involving lysosomal endosomes / S.S. Mambula, S.K. Calderwood // *J. Immunol.* – 2006. – Vol.177 – P. 7849-7857.

174. Matsui, H. Some characteristics of fluoride-induced cell death in rat thymocytes: cytotoxicity of sodium fluoride / H. Matsui, M. Morimoto, K. Horimoto (et al.) // *Toxicol In Vitro*. – 2007. – Vol.21, №6. – P.1113-20.

175. Maulik, N. Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulating Anti-death gene Bcl-2 / N. Maulik, R.M. Engelman, J.A. Rouson (et al.) // *Circulation*. – 1999. – Vol.100 (Suppl 2). – P.369-375.

176. McCoubrey, W.K. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3 / W.K. McCoubrey, T.J. Huang, M.D. Maines // *Eur. J. Biochem*. – 1997. – Vol.247. – P.725-732.

177. Melling, C.W. Exercise-mediated regulation of Hsp70 expression following aerobic exercise training / C.W. Melling, D.B. Thorp, K.J. Milne (et al.) // *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. – 2007. – Vol.293. – P.3692-3698.

178. Mendoza-Schulz, A. The effects of fluoride on cell migration, cell proliferation, and cell metabolism in GH4C1 pituitary tumour cells / A. Mendoza-Schulz, C. Solano-Agama, L. Arreola-Mendoza (et al.) // *Toxicol. Lett*. – 2009. – Vol. 190. – P.179-186.

179. Mittal, M. Effects of individual and combined exposure to sodium arsenite and sodium fluoride on tissue oxidative stress, arsenic and fluoride levels in male mice / M. Mittal, S.J. Flora // *Chem. Biol. Interact*. – 2006. – Vol.162. – P.128-139.

180. Mizushima, Y. Review: recent advances in lipid microsphere technology for targeting prostaglandin delivery / Y. Mizushima, K. Hoshi // *J Drug Target*. – 1993. – Vol.1, №2. – P.93-100.

181. Motterlini, R. Endothelial heme oxygenase-1 induction by hypoxia / R. Motterlini, R. Foresti, R. Bassi (et al.) // *J. Biol. Chem*. – 2000. – Vol.275, №18. – P.13613-13620.

182. Multhoff, G. Heat shock protein (Hsp70) stimulates proliferation and cytolytic activity of natural killer cells / G. Multhoff, L. Mizzen, C.C. Winchester (et al.) // *J. Exp. Hematol*. – 1999. – Vol.27. – P.1627-1636.

183. Murphy, J.E. Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors / J.E. Murphy, P.R. Tedbury, S. Homer-Vanniasinkam (et al.) // *Atherosclerosis*. – 2005. – Vol.182. – P.1-15.
184. Narayanan, N. Inhibitory and stimulatory effects of fluoride on the calcium pump of cardiac sarcoplasmic reticulum / N. Narayanan, N. Su, P. Bedard // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1991. – Vol.1070. – P.83-91.
185. Ohkawa, H. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction / H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi // *Analyt.Biochem.* – 1979. – Vol.95. – P.351-358.
186. Otsuki, S. Possible link between glycolysis and apoptosis induced by sodium fluoride / S. Otsuki, S.R. Morshed, S.A. Chowdhury (et al.) // *Journal of Dental Research*. – 2005. – Vol.84. – P.919-923.
187. Patten, D.A. Hypoxia-inducible Factor-1 activation in nonhypoxic conditions: the essential role of mitochondrial-derived reactive oxygen species / D.A. Patten, V.N. Lafleur, G.A. Robitaille (et al.) // *Mol. Biol. Cell*. – 2010. – Vol.21. – P.3247-3257.
188. Peerce, B.E. Effect of substrates and pH on the intestinal Na⁺/phosphate co-transporter: evidence for an intervesicular divalent phosphate allosteric regulatory site / B.E. Peerce // *Biochim Biophys Acta*. – 1995. – Vol.1239, №1. – P.1-10.
189. Peng, J. Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements / J. Peng // *Free Radic. Biol. Med.* – 2000. – Vol.28. – P.1598-1606.
190. Pereira, S. Proteomic analysis of liver in rats chronically exposed to fluoride / S. Pereira, A. de Lima Leite, S. Charone (et al.) // *PLOS ONE*. – 2013. – Vol.8 (9). – P.1-11.
191. Pockley, A.G. Circulating heat shock protein and heat shock protein antibody levels in established hypertension / A.G. Pockley, U. De Faire, R. Kiessling (et al.) // *J. Hypertens*. – 2002. – Vol.20. – P.1815-1820.
192. Pockley, A.G. Serum heat shock protein 70 levels predict the development of atherosclerosis in subjects with established hypertension / A.G. Pockley, A. Georgiades, T. Thulin (et al.) // *Hypertension*. – 2003. – Vol.42 – P.235-238.

193. Poole, L.B. Protein sulfenic acids in redox signaling / L.B. Poole, P.A. Karplus, A. Claiborne // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2004. – Vol.44. – P.325-347.
194. Purdom-Dickinson, S.E. Translational control of Nrf2 protein in activation of antioxidant response by oxidants / S.E. Purdom-Dickinson, E.V. Sheveleva, H. Sun (et al.) // *Mol. Pharmacol.* – 2007. – Vol.72, № 4. – P.1074-1081.
195. Rać, M.E. Guanine and inosine nucleotides, nucleosides and oxypurines in snail muscles as potential biomarkers of fluoride toxicity / M.E. Rać, K. Safranow, B. Doiegowska (et al.) // *Folia Biol. (Krakow).* – 2007. – Vol.55, №3-4. – P.153-160.
196. Radi, R. Detection of catalase in rat heart mitochondria / R. Radi, J.F. Turrens, L.Y. Chang (et al.) // *J. Biol. Chem.* – 1991. – Vol.266. – P.22028-22034.
197. Reddy, G.B. Antioxidant defence system and lipid peroxidation in patients with skeletal fluorosis and in fluoride-intoxicated rabbits / G.B. Reddy // *Toxicol Sci.* – 2003. – Vol.72, № 2. – P.363-368.
198. Refsnes, M. Fluoride-induced apoptosis in human epithelial lung cells (A549 cells): role of different G protein-linked signal systems / M. Refsnes, P.E. Schwarze, J.A. Holme (et al.) // *Hum Exp Toxicol.* – 2003. – Vol.22, №3. – P.111-123.
199. Refsnes, M. Involvement of protein kinase C in fluoride-induced apoptosis in different types of lung cells / M. Refsnes, H. Kersten, P.E. Schwarze (et al.) // *Ann N Y Acad Sci.* – 2002. – Vol.973. – P.218-220.
200. Reyland, M.E. PKC and the control of apoptosis, Protein kinase C in cancer signaling and therapy / M.E. Reyland, A.P. Bradford // *Current Cancer Research.* – 2010. – Vol. 2. – P.189-222.
201. Ryter, S.W. The heme synthesis and degradation pathway: role in oxidant sensitivity / S.W. Ryter, R.M. Tyrrell // *Free Radic. Biol. Med.* – 2000. – Vol.8. – P.289-309.
202. Salgado-Bustamante, M. Pattern of expression of apoptosis and inflammatory genes in humans exposed to arsenic and/or fluoride / M. Salgado-Bustamante, E. Ortiz-Pérez, L. Calderón-Aranda (et al.) // *Science of the Total Environment.* – 2010. – Vol.408. – P.760-767.

203. Sando, T. Purification and characterization of rat liver cytosol catalase / T. Sando, K. Konno, N. Takei (et al.) // *Cell. Struct. Funct.* – 1984. – Vol.9. – P.125–133.
204. Sazontova, T.G. Regularity of the modulation of cell antioxidative status in response of the activation of free radical oxidation / T.G. Sazontova // *Hypoxia Med. J.* – 2002. – №1-2. – P.2-9.
205. Scapagnini, G. Gene expression profiles of heme oxygenase isoforms in the rat brain / G. Scapagnini, V. D'Agata, V. Calabrese (et al.) // *Brain Res.* – 2002. – Vol.954, №1. – P.51-59.
206. Schroedl, C. Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1alpha requires mitochondrial reactive oxygen species / C. Schroedl, D.S. McClintock, G.R. Budinger (et al.) // *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* – 2002. – Vol.283, №5. – P.L922-L931.
207. Semenza, G.L. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor-1 / G.L. Semenza // *Biochem. J.* – 2007. – Vol.405. – P.1-9.
208. Semenza, G.L. HIF1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia / G.L. Semenza // *J. Appl. Physiol.* – 2000. – Vol.88. – P.1474–1480.
209. Semenza, G.L. HIF1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia / G.L. Semenza // *J. Appl. Physiol.* – 2000. – Vol.88. – P.1474–1480.
210. Semenza, G.L. Perspectives on oxygen sensing / G.L. Semenza // *Cell.* – 1999. – Vol.98. – P.281-284.
211. Semenza, G.L. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1 / G.L. Semenza // *Biochem. Pharmacol.* – 2002. – Vol.64. – P.993-998.
212. Shanthakumari, D. Effect of fluoride intoxication on lipid peroxidation and antioxidant status in experimental rats / D. Shanthakumari, S. Srinivasalu, S. Subramanian // *Toxicology.* – 2004. – Vol.204. – P.219-228.
213. Shih, A.Y. Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress / A.Y. Shih, D.A. Johnson, G. Wong (et al.) // *J Neurosci.* – 2003. – Vol.23. – P.3394-3406.
214. Shinkai, M. Oxygen stress effects on proliferation rates and heat shock pro-

teins in lymphocytes / M. Shinkai, N. Shinomiya, S. Kanoh (et al.) // *Aviat Space and Environ Med.* – 2004. – Vol.75, № 2. – P.109-113.

215. Shivarajashankara, Y.M. Effect of fluoride intoxication on lipid peroxidation and antioxidant systems in rats / Y.M. Shivarajashankara, A.R. Shivashankara, P.G. Bhat (et al.) // *Fluoride.* – 2001. – №34. – P.108-113.

216. Shivarajashankara, Y.M. Lipid peroxidation and antioxidant systems in the blood of young rats subjected to chronic fluoride toxicity / Y.M. Shivarajashankara, A.R. Shivashankara, P.G. Bhat (et al.) // *Indian J. Exp. Biol.* – 2003. – Vol.41. №8. – P.857-860.

217. Simon, M.C. Coming up for air: HIF-1 and mitochondrial oxygen consumption / M.C. Simon // *Cell Metab.* – 2006. – Vol.3. – P.150-151.

218. Sireli, M. The effect of acute fluoride poisoning on nitric oxide and methemoglobin formation in the Guinea pig, Turk / M. Sireli, A. Bulbul, J. Vet // *Anim. Sci.* – 2004. – Vol.28. – P.591-595.

219. Soti, C. Aging cellular networks: chaperones as major participants / C. Soti, P. Csermely // *Exp. Gerontol.* – 2007. – Vol.42 – P.113-119.

220. Srinivas, V. Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) is a non-heme iron protein / V. Srinivas, X. Zhu, S. Salceda (et al.) // *Biochem. J.* – 1998. – Vol.273, №29. – P.18019-18022.

221. Sternweis, P.C. Aluminum: a requirement for activation of the regulatory component of adenylate cyclase by fluoride / P.C. Sternweis, A.G. Gilman // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1982. – Vol.79. №16. – P.4888-4891.

222. Stroka, D.M. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia / D.M. Stroka, T. Burkhardt, I. Desbaillets (et al.) // *FASEB J.* – 2001. – Vol.15, №13. – P.2445-2453.

223. Suketa, Y. Effect of fluoride on the activities of the Na⁺/glucose cotransporter and Na⁺/K⁽⁺⁾-ATPase in brush border and basolateral membranes of rat kidney (in vitro and in vivo) / Y. Suketa, K. Suzuki, T. Taki // *Biol.Pharm.Bull.* – 1995. – Vol.18, № 2. – P. 273-278.

224. Sumbayev, V.V. Role of MAP kinase-dependent apoptotic pathway in innate immune responses and viral infection / V.V. Sumbayev, I.M. Yasinska // *Scand. J. Immunol.* – 2006. – Vol.63. – P. 391-400.
225. Sun, Z. Fluoride-induced apoptosis and gene expression profiling in mice sperm in vivo / Z. Sun, R. Niu, B. Wang (et al.) // *Archives of Toxicology.* – 2011. – Vol.85. – P.1441-1452.
226. Susheela, A.K. Adenil cyclase activity following fluoride ingestion / A.K. Susheela, M. Sing // *Toxicol. Lett.* – 1982. – Vol.10, №2-3. – P.209-212.
227. Suska, M. The effect of sodium fluoride on the adenine nucleotide pool in erythrocytes of Wistar rats / M. Suska // *Int. J. Occup. Med. Environ. Health.* – 2001. – Vol.14. №4. – P.369-373.
228. Theriault, J.R. Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelia/epithelial cells / J.R. Theriault, S.S. Mambula, T. Sawamura (et al.) // *Clin. Exp. Immunol.* – 2005. – Vol.103. – P.77-82.
229. Thrane, E.V. Fluoride-induced apoptosis in epithelial lung cells involves activation of MAP kinases p38 and possibly JNK / E.V. Thrane, M. Refsnes, G.H. Thoresen (et al.) // *Toxicol Sci.* – 2001. – Vol.61, №1. – P.83-91.
230. Toone, W.M. Redox control of AP-1-like factors in yeast and beyond / W.M. Toone, B.A. Morgan, N. Jones // *Oncogene.* – 2001. – Vol.20, №19. – P.2336-2346.
231. Vabulas, R.M. Hsp70 as endogenous stimulus of the Toll/Interleukin-1 receptor signal pathway / R.M. Vabulas, P. Ahmad-Nejad, S. Ghose (et al.) // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol.277. – P.15107-15112.
232. Venkateswarlu, P. Determination of fluorine in biological materials: a review / P. Venkateswarlu // *Adv Dent Res.* – 1994. – Vol.8, №1. – P.80-86.
233. Wang, A.G. Effects of fluoride on lipid peroxidation, DNA damage and apoptosis in human embryo hepatocytes / A.G. Wang, Q.L. Chu, M. Zhang (et al.) // *Biomed Environ Sci.* – 2004. – Vol.17 (2). – P.217-222.

234. Wang, H. Fluoride-induced thyroid dysfunction in rats: roles of dietary protein and calcium level / H. Wang, Z. Yang, B. Zhou (et al.) // *Toxicol. Ind. Health.* – 2009. – Vol.25, №1. – P.49-57.
235. Wang, Y.N. Effect of long term fluoride exposure on lipid composition in rat liver / Y.N. Wang, K.Q. Xiao, J.L. Liu (et al.) // *Toxicology.* – 2000. – Vol.146, №2-3. – P.161-169.
236. Weidemann, A. Biology of HIF-1 α / A. Weidemann, R.S. Johnson // *Cell Death and Differentiation.* – 2008. – Vol.15. – P.621-627.
237. Wenger, R.H. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression / R.H. Wenger // *FASEB J.* – 2002. – Vol.16. – P.1151-1162.
238. Whitford, G.M. Strategies for improving the assessment of fluoride accumulation in body fluids and tissues: Report for Working Group I / G.M. Whitford, J.W. Bawden, W.H. Bowen (et al.) // *Adv. Dent. Res.* – 1994. – №8. – P.113–115.
239. Wiesener, M.S. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 α / M.S. Wiesener // *Blood.* – 1998. – Vol.92. – P.2260-2268.
240. Xu, H. Effect of sodium fluoride on the expression of bcl-2 family and osteopontin in rat renal tubular cells / H. Xu, X.Q. Jin, L. Jing (et al.) // *Biol Trace Elem Res.* – 2006. - Vol.109. №1. – P.55-60.
241. Xu, H. Proteomic analysis of kidney in fluoride-treated rat / H. Xu, L.S. Hu, M. Chang (et al.) // *Toxicol. Lett.* – 2005. – Vol. 160. №1. – P.69-75.
242. Xu, H. Proteomic analysis of osteoblasts exposed to fluoride in vitro / H. Xu, L. Jing, G.S. Li // *Biol. Trace Elem. J. Neuroche Res.* – 2008. – Vol.123. №1–3. – P.91-97.
243. Yan, X. Effects of sodium fluoride treatment in vitro on cell proliferation, apoptosis and caspase-3 and caspase-9 mRNA expression by neonatal rat osteoblasts / X. Yan, C. Feng, Q. Chen (et al.) // *Arch Toxicol.* – 2009. - Vol.83, №5. – P.451-458.

244. Yang, S. Sodium fluoride induces apoptosis and alters bcl-2 family protein expression in MC3T3-E1 osteoblastic cells / S. Yang, Z. Wang, C. Farquharson (et al.) // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2011. - Vol.410. № 4. – P.910-915.

245. Yang, Z.Z. Redox regulation of HIF-1 α levels and HO-1 expression in renal medullary interstitial cells / Z.Z. Yang, A.Y. Zhang, F.X. Yi (et al.) // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2003. – Vol.284. – P.F1207-F1215.

246. Yuan, G. Induction of HIF-1 α expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca²⁺ signaling, prolyl hydroxylases and mTOR / G. Yuan, J. Nanduri, S. Khan (et al.) // *J. Cell. Physiol.* – 2008. – Vol.217, № 3. – P.674–685.

247. Zachary, R. Heme oxygenase-2: Endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation / R. Zachary, S.P. Gaine, J.L. Dinerman (et al.) // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1996. – Vol.93. – P.795-798.

248. Zerwekh, J.E. Fluoride rapidly and transiently raises intracellular calcium in human osteoblasts / J.E. Zerwekh, A.C. Morris, P.K. Padalino (et al.) // *J. Bone Miner. Res.* – 1990. – №5. – P.131-136.

249. Zhan, X.A. Evaluation of caspase-dependent apoptosis during fluoride-induced liver lesion in pigs / X.A. Zhan, M. Wang, Z.R. Xu (et al.) // *Arch Toxicol.* – 2006. – Vol.80, №2. – P.74-80.

250. Zhang, G.X. Role of mitochondria in angiotensin II-induced reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase activation / G.X. Zhang, X.M. Lu, S. Kimura (et al.) // *Cardiovasc. Res.* – 2007. – №76. – P.204-212.

251. Zhang, W.L. Expression of proto-oncogenes c-fos and c-jun in osteoblasts activated by excessive fluoride / W.L. Zhang, Y.N. Cui, S. Gao (et al.) // *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* – 2003. – Vol.37 (4). – P.246-50.

252. Zhong, H. Modulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics / H. Zhong, K. Chiles, D. Feldser (et al.) // *Cancer. Res.* – 2000. – Vol.60. – P.1541-1545.

253. Zhonghua, Yu. Expression of proto-oncogenes c-fos and c-jun in osteoblasts activated by excessive fluoride / Yu. Zhonghua, Yi. Fang, Z.Z. Xue // 2003. – Vol.37 (4). – P.246-50.

254. Zhukova, A.G. Heme oxygenase: function, regulation, biological role / A.G. Zhukova, T.G. Sazontova // Hypoxia Med. J. – 2004. – № 3-4 – P.30-43.

255. Zhukova, A.G. Hypoxia inducible factor (HIF) - alpha: function and biological role / A.G. Zhukova, T.G. Sazontova // Hypoxia Medical Journal. – 2005. – № 3-4. – P.34-41.