

УДК 613.62:616.36

А.Г. Жукова, Н.Н. Михайлова, Т.К. Ядыкина, Д.А. Алехина, Л.Г. Горохова, Д.В. Романенко, М.С. Бугаева

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ЗАЩИТНЫХ МЕХАНИЗМОВ ПЕЧЕНИ В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ФТОРИСТОЙ ИНТОКСИКАЦИИ**

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний», 23, ул. Кутузова, Новокузнецк, Россия, 654041

Исследованы внутриклеточные защитные механизмы печени в динамике развития хронической фтористой интоксикации. Показано, что на ранних стадиях затравки фтором (1–3 недели) в печени увеличивался синтез защитных белков HIF-1 $\alpha$ , HOx-1, HOx-2 и HSP72, ограничивающий свободнорадикальное окисление в гепатоцитах. На поздних сроках хронической фтористой интоксикации (6–12 недель) повреждающий эффект фтора обусловлен его генотоксичностью — способностью угнетать синтез внутриклеточных защитных белков и ферментов основных метаболических циклов в печени.

**Ключевые слова:** хроническая фтористая интоксикация, фактор транскрипции HIF-1 $\alpha$ , HOx-1, HOx-2, HSP72, свободнорадикальное окисление, ферменты печени.

A.G. Zhukova, N.N. Mikhailova, T.K. Yadykina, D.A. Alekhina, L.G. Gorokhova, D.V. Romanenko, M.S. Bugaeva.  
**Experimental studies of intracellular liver protective mechanisms in development of chronic fluorine intoxication**  
FSBSI «Research Institute for Complex Problems of Hygiene and Occupational Diseases», 23, Kutuzov str., Novokuznetsk, Russia, 654041

The authors studied intracellular liver protective mechanisms in development of chronic fluorine intoxication. Findings are that synthesis of protective proteins HIF-1 $\alpha$ , HOx-1, HOx-2 and HSP72, restricting free radical oxidation in hepatocytes increased in liver at early stages (1–3 weeks) of exposure to fluorine. At late terms of chronic fluorine intoxication (6–12 weeks), damaging effects of fluorine result from its genotoxicity — ability to suppress synthesis of intracellular protective proteins and enzymes of main metabolic cycles in liver.

**Key words:** chronic fluorine intoxication, transcription factor of HIF-1 $\alpha$ , HOx-1, HOx-2 and HSP72, free radical oxidation, liver enzymes.

Загрязнение окружающей среды фторидами является одной из актуальных эколого-гигиенических проблем, поскольку избыточное поступление фтора в организм приводит к развитию хронической фтористой интоксикации (ХФИ). При этом ХФИ сопровождается развитием окислительного стресса, обусловленным избыточным образованием активных форм кислорода (АФК), одним из источников которых, а также их прямой мишенью является печень [16].

Известно, что АФК являются важными компонентами внутриклеточной редокс-сигнальной системы. Следствием инициации этой системы является активация ядерных факторов транскрипции, обеспечивающих мобилизацию защитных механизмов организма для формирования адаптивных реакций при действии стрессорных факторов [7]. Мишенями фактора транскрипции HIF-1 $\alpha$  являются гены, продукты которых регулируют энергетический обмен, синтез антиоксидантных ферментов и стресс-белков семейства HSP при повреждающих воздействиях [5].

Недавними исследованиями было показано, что длительное действие фтора на организм вызывает изменение активности свободнорадикальных процессов и индукцию АФК-опосредованных метаболических путей в миокарде [4] и легких [1] подопытных крыс. Од-

нако в настоящее время мало известно об изменении уровня фактора транскрипции HIF-1 $\alpha$ , стресс-белков семейства HSP и свободнорадикальных процессов в печени в динамике развития ХФИ. Поэтому **целью исследования** было изучение внутриклеточных защитных механизмов печени в динамике развития ХФИ.

**Материалы и методики.** Эксперименты проводены на 80 белых нелинейных крысах-самцах в соответствии с международными правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных целей «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals». ХФИ моделировали в течение 12 недель свободным доступом животных к раствору фторида натрия (NaF) в концентрации 10 мг/л.

Животных усыпляли на 3, 6 сутки, через 3, 6, 9 и 12 недель ХФИ. Выделяли печень и замораживали в жидком азоте. Гомогенизирование печени проводили в среде 50 мМ Tris — HCl, 100 мМ NaCl (pH 7,2 при 0° C) в соотношении «ткань : среда», равном 1:12, с помощью гомогенизатора тефлон — стекло при 800 об/мин. в течение 1 мин. Активность основных ферментов метаболизма аспаратаминотрансферазы (АсАТ), аланинаминотрансферазы (АлАТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и  $\gamma$ -глутамилтрансферазы ( $\gamma$ -ГТ) определяли уни-

фицированными методами с помощью реактивов ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск). Активность ферментов антиоксидантной защиты определяли спектрофотометрически по классическим методам, каталазы — по методу Luck H. [11], СОД — методом Fridovich I. [9].

Уровень внутриклеточных защитных систем — фактора транскрипции HIF-1 $\alpha$ , индуцибельных белков — HSP72 и гем-оксигеназы-1 (HOx-1) и конститутивных белков HSC73 и HOx-2 определяли методом Western-блот с использованием 8–10%-го полиакриламидного геля и переносом на PVDF-мембрану.

Повреждающее действие фтора на ткань печени оценивали по устойчивости мембранных структур к свободнорадикальному окислению, индуцированному in vitro системой с аскорбатом 0,2 мМ и концентрацией белка не выше 2,5 мг/мл. Уровень свободнорадикальных продуктов оценивали по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой по классическому методу Ohkawa H. et al. [12] в модификации Kikugawa K. et al. [10].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0. Для сравнения независимых выборок использовали непараметрический Mann-Whitney U-Test. Раз-

личия между выборками считались достоверными при  $p \leq 0,05$ . Результаты эксперимента в таблицах и на рисунках представлены в виде медианы.

**Результаты и обсуждение.** Затравка крыс фторидом натрия на ранних сроках ХФИ изменила в печени уровень активности внутриклеточных защитных систем (рис., табл. 1), посредством усиления окислительно-восстановительных реакций в гепатоцитах. К третьей неделе ХФИ в 1,5 раза увеличился уровень фактора транскрипции HIF-1 $\alpha$ , что привело к активации генов, вовлеченных в метаболизм и регуляцию свободнорадикальных процессов в ткани печени. Из рисунка видно, что на третьи сутки ХФИ активировался синтез HSP72, HOx-1 и HOx-2. На 6-е сутки эксперимента уровень этих защитных белков снижался до исходного уровня, что может быть связано с их выходом во внеклеточное пространство и кровоток. При выходе во внеклеточную среду белки HSP оказывают ряд эффектов на клетки системы врожденного иммунитета [3]. В экспериментах HSP72 индуцировал секрецию TNF $\alpha$  и IL-8, а HOx-1 — увеличение уровня IL-1 $\beta$ , IL-4 и IL-10 [6]. На 3 неделе ХФИ зарегистрировано новое повышение уровня HSP72, HOx-1

Таблица 1

**Влияние хронической фтористой интоксикации на активность ферментов антиоксидантной защиты в ткани печени экспериментальных крыс**

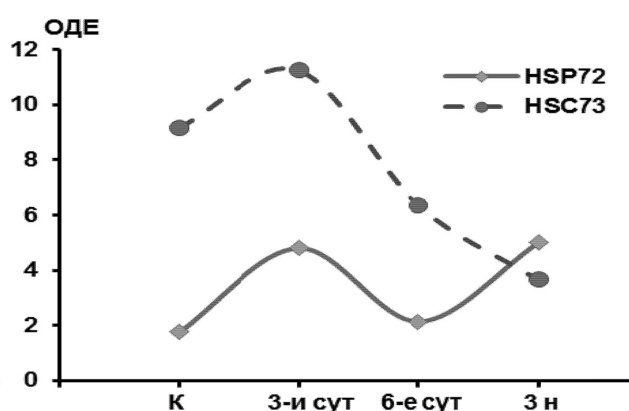
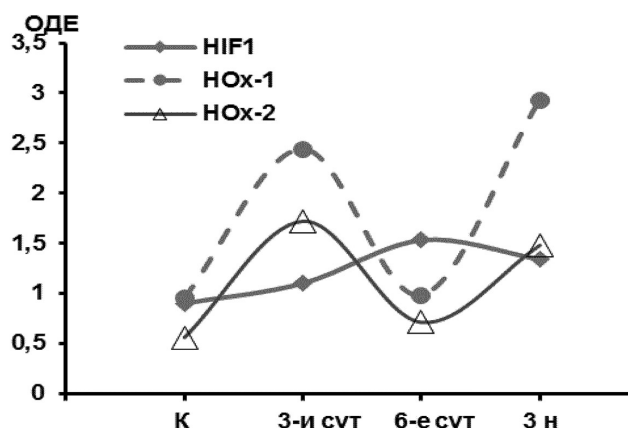
| Длительность затравки | СОД, у.е./г белка |       | Каталаза, мкМ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /мин/г белка |       |
|-----------------------|-------------------|-------|----------------------------------------------------------|-------|
|                       | Контроль          | ХФИ   | Контроль                                                 | ХФИ   |
| 3-и сутки             | 0,27              | 0,44* | 18,7                                                     | 33,5* |
| 6-е сутки             | 0,27              | 0,98* | 18,7                                                     | 38,0  |
| 3 недели              | 1,2               | 0,85  | 43,2                                                     | 39,65 |
| 6 недель              | 0,37              | 0,25* | 12,6                                                     | 13,9  |
| 9 недель              | 0,5               | 1,15* | 36,7                                                     | 52,4* |
| 12 недель             | 0,5               | 0,45  | 36,7                                                     | 43,3  |

Таблица 2

**Изменение активности основных ферментов метаболизма (ЕА/г сыр. тк.) в печени крыс в динамике хронической фтористой интоксикации**

| Группа    | АсАТ    | АлАТ    | ЩФ       | $\gamma$ -ГТ | ЛДГ     |
|-----------|---------|---------|----------|--------------|---------|
| Контроль  | 52,8    | 78,6    | 790,2    | 14,8         | 674,5   |
| 3-и сутки | 33,9*↓  | 100,5*↑ | 497,6*↓  | 13,1         | 647,4   |
| 6-е сутки | 42,8    | 50      | 772,8    | 13,2         | 394,2*↓ |
| 3 недели  | 52,6    | 61,3*↓  | 1204,4*↑ | 16,7         | 653,05  |
| 6 недель  | 102,9*↑ | 47,8*↓  | 779,5    | 14,0         | 421,6*↓ |
| 9 недель  | 49      | 91,5    | 735,3    | 26,0*↑       | 471,5   |
| 12 недель | 11,6*↓  | 68,2    | 1045*↑   | 14,3         | 1440*↑  |

Примечание к таблицам 1–2: \* — достоверность отличий ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с контролем (Mann-Whitney U-test).



**Рис. Уровень защитных белков в клетках печени экспериментальных крыс на ранних стадиях хронической фтористой интоксикации**

Примечания: К — контроль; 3 н — 3 недели; ОДЕ — относительные денситометрические единицы.

и НОх-2 (рис.). Увеличение уровня HIF-1 $\alpha$  имело триггерное влияние на антиоксидантные ферменты в печени. Так, активность антиоксидантных ферментов при ХФИ превышала контрольные значения: СОД в 3,6 раза, каталазы в 2 раза (табл. 1).

Такая значительная активация внутриклеточных защитных белков поддерживала физиологическую устойчивость мембранных структур печени к индукции свободнорадикальных процессов *in vitro*.

Одновременно с активацией синтеза защитных белков при поступлении фтора в организм происходило изменение активности основных метаболических путей в печени. Из табл. 2 видно, что на ранних сроках ХФИ (с третьих суток до третьей недели) изменялась активность АсАТ, АлАТ, ЩФ и ЛДГ. Изменение активности этих ферментов носило нелинейный характер. На третьи и шестые сутки снижалась активность АсАТ, ЩФ, ЛДГ на фоне увеличения активности АлАТ. К третьей 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.

Увеличение активности АлАТ обеспечивает работу глюкозо-аланинового шунта, тогда как снижение АсАТ свидетельствует о торможении катаболических процессов в печени (в частности, цикла Кребса). Кроме того, субстрат фермента АсАТ — аспартат может расходоваться для построения других аминокислот, необходимых для синтеза белка. Имеются данные, что фтор изменяет метаболизм в печени — ингибирует ферменты цикла Кребса, но при этом компенсаторно увеличивает активность ферментов гликолиза альдолазы и пируватдегидрогеназы [13]. При этом считается, что избыточная экспрессия альдолазы — это компенсаторный механизм, поддерживающий интенсивность гликолиза. Синтезированная глюкоза затем поступает в кровь для снабжения других органов.

Важную роль в регуляции метаболизма в печени на ранних сроках ХФИ играет фактор транскрипции HIF-1 $\alpha$ . Этот защитный белок может активировать синтез переносчиков глюкозы, гликолитических ферментов и путь, предотвращающий образование АФК, усиливает синтез субъединицы цитохром-с-оксидазы СОХ4-2 и протеазы, разрушающей субъединицу цитохром-с-оксидазы СОХ4-1. Эти изменения замедляют передачу электронов по дыхательной цепи и приводят к оптимизации дыхательного комплекса митохондрий IV для работы в условиях недостатка кислорода [14, 15]. В результате образование АФК снижается, что подтверждается данными по устойчивости мембранных структур печени к индукции свободнорадикального окисления. Кроме того, HIF-1 $\alpha$  опосредует изменения транспорта глюкозы и гликолитических ферментов, что приводит к эффекту Пастера — уменьшению скорости потребления глюкозы и прекращению накопления лактата [18].

Таким образом, на ранних сроках ХФИ (третьи сутки — три недели) в печени происходит активация синтеза защитных белков HIF-1 $\alpha$ , НОх-1, НОх-2 и HSP72, что является срочной адаптивной реакцией на поступление фтора в организм.

Увеличение сроков затравки фтором до 12 недель характеризовалось разнонаправленными изменениями метаболизма в ткани печени. Начиная с 6-й недели происходило смещение про- и антиоксидантного равновесия в сторону активации свободнорадикальных процессов (см. табл. 1). Видно, что активность СОД на 6-й неделе снижалась на 32%. В результате почти в 2 раза повышалась чувствительность мембранных структур печени к индукции свободнорадикального окисления *in vitro*. Кроме того, показано, что хроническое действие фтора ингибирует синтез защитных белков, таких как HIF-1 $\alpha$  и HSP, что согласуется с литературными данными [8].

На 9-й неделе эксперимента, несмотря на достоверное повышение активности антиоксидантных ферментов — СОД (в 2 раза) и каталазы (в 1,4 раза), в печени увеличивался начальный уровень продуктов свободнорадикального окисления (в 1,4 раза) и снижалась резистентность мембранных структур ткани (в 1,3 раза).

На 12-й неделе эксперимента в мембранах печени регистрировалась низкая интенсивность свободнорадикальных процессов, что, возможно, связано со снижением уровня их субстратов — фосфолипидов [17]. Ранее было показано, что ХФИ приводила к снижению в ткани печени уровня фосфолипидов за счет снижения фосфатидилэтаноламина, фосфатидилохолина и фосфатидилсерина. Интоксикация фтором сопровождалась снижением уровня полиненасыщенных жирных кислот и увеличением уровня насыщенных жирных кислот — пальмитиновой и стеариновой — в мембранах гепатоцитов [17].

Избыточная активация свободнорадикальных процессов в сочетании с недостаточностью компенсаторных возможностей антиоксидантных систем может привести к развитию новых или усугублению уже существующих патологических изменений в организме [5, 7]. На 6-й неделе ХФИ в 2 раза повышалась активность АсАТ на фоне полуторакратного снижения активности АлАТ и ЛДГ (см. табл. 2). К 12-й неделе активность АсАТ снижалась в 4,5 раза, тогда как активность ЛДГ повышалась в 2 раза по сравнению с контролем. К этому сроку исследования в 1,3 раза повышалась активность ЩФ. Активность мембраносвязанной  $\gamma$ -ГТ, участвующей в транспорте аминокислот в клетки и в системе детоксикации организма, повышалась почти в два раза только на 9-й неделе ХФИ. Эти данные свидетельствуют о невозможности достижения метаболического баланса в условиях значительного накопления фторида натрия в организме, обуславливающего развитие патологических изменений в ткани печени на поздних сроках ХФИ.

Результаты, полученные на молекулярном уровне, согласуются с данными гистологических исследований ткани печени [2].

**Заключение.** Таким образом, печень является высокочувствительным органом к длительному поступлению фтора в организм. На ранних сроках ХФИ в ткани печени увеличивается синтез внутриклеточных защитных белков — HIF-1 $\alpha$ , HOX-1, HOX-2 и HSP72, ограничивающий свободнорадикальные процессы и обеспечивающий функционирование гепатоцитов в неблагоприятных условиях. При длительном поступлении фтора в организм основными повреждающими факторами для печени являются ингибирование метаболических путей, активация свободнорадикальных процессов, мембранные нарушения гепатоцитов. Кроме того, повреждающий эффект фтора может быть обусловлен его генотоксичностью — способностью угнетать синтез внутриклеточных защитных белков и антиоксидантных ферментов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (см. REFERENCES стр. 8–18)

1. Алехина Д.А., Зубкова М.В., Климов С.В., Жукова А.Г. // Общие закономерности формирования профессиональных и экологически обусловленных заболеваний: патогенез, диагностика, профилактика: сб. материалов Всеросс. конф. — Ангарск — Иркутск, 2014. — С. 137–140.
2. Бугаева М.С. // Вестник Кузбасской государственной педагогической академии. — 2013. — № 1 (26). — С. 66–70.
3. Евдонин А.А., Медведева Н.Д. // Цитология. — 2009. — Т. 51, № 2. — С. 130–137.
4. Жукова А.Г., Алехина Д.А., Сазонтова Т.Г. и др. // Бюлл. эксперимент. биологии и мед. — 2013. — Т. 156, № 8. — С. 190–194.
5. Жукова А.Г. Молекулярные механизмы адаптации к изменению уровня кислорода (Роль свободнорадикального окисления). — Germany: Palmarium academic publishing, 2012. — 196 с.
6. Михайлова Н.Н., Сазонтова Т.Г., Алехина Д.А. и др. // Цитокины и воспаление. — 2013. — Вып. 4. — С. 71–76.
7. Сазонтова Т.Г., Жукова А.Г., Анчишкина Н.А., Архипенко Ю.В. // Вестн. РАМН. — 2007. — № 2. — С. 17–25.

## REFERENCES

1. Alekhina D.A., Zubkova M.V., Klimov S.V., Zhukova A.G. General principles of occupational and ecologically conditioned diseases formation: pathogenesis, diagnosis, prevention. Proceedings of Russian conference. — Angarsk-Irkutsk, 2014. — P. 137–140 (in Russian).
2. Bugaeva M.S. // Vestnik Kuzbasskoy gosudarstvennoy pedagogicheskoy akademii. — 2013. — 1 (26). — P. 66–70 (in Russian).
3. Evdonin A.A., Medvedeva N.D. // Tsitologiya. — 2009. — Vol 51. — 2. — P. 130–137 (in Russian).
4. Zhukova A.G., Alekhina D.A., Sazontova T.G., et al. // Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny. — 2013. — Vol 156. — 8. — P. 190–194 (in Russian).
5. Zhukova A.G. Molecular mechanisms of adaptation to changes in oxygen level (Role of free radical oxidation). —

Germany: Palmarium academic publishing, 2012. — 196 p (in Russian).

6. Mikhaylova N.N., Sazontova T.G., Alekhina D.A., et al. // Tsitokiny i vospalenie. — 2013. — issue 4. — P. 71–76 (in Russian).
7. Sazontova T.G., Zhukova A.G., Anchishkina N.A., Arkhipenko Yu.V. // Vestn. Ros. akad. med. nauk. — 2007. — 2. — P. 17–25 (in Russian).
8. Chen Q., Wang Z., Xiong Y. et al. // J. Toxicol. Sci. — 2009. — Vol. 34. — P. 399–405.
9. Fridovich I. // Ann. NY Acad. Sci. — 1999. — Vol. 893. — P. 13–18.
10. Kikugawa K., Kojima T., Yamaki S. et al. // Analyt. Biochem. — 1992. — Vol. 202. — P. 249–255.
11. Luck H. // Methods of enzymatic analysis / Bergmeyer H.U. (ed.). — New York: Verlag-Chemie Academic Press., 1963. — P. 885–888.
12. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. // Analyt. Biochem. — 1979. — Vol. 95. — P. 351–358.
13. Pereira S., de Lima Leite A., Charone S. et al. // Plos One. — 2013. — Vol. 8, № 9. — P. 1–11.
14. Semenza G.L. // Biochem. J. — 2007. — Vol. 405. — P. 1–9.
15. Simon M.C. // Cell Metab. — 2006. — Vol. 3. — P. 150–151.
16. Wang A.G., Chu Q.L., Zhang M. et al. // Biomed Environ Sci. — 2004. — Vol. 17, № 2. — P. 217–222.
17. Wang Y.N., Xiao K.Q., Liu J.L. et al. // Toxicology. — 2000. — Vol. 146, № 2–3. — P. 161–169.
18. Weidemann A., Johnson R.S. // Cell Death and Differentiation. — 2008. — Vol. 15. — P. 621–627.

Поступила 16.02.2016

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

- Жукова Анна Геннадьевна (Zhukova A.G.),  
вед. науч. сотр. лаб. эксп. гигиенич. иссл. ФГБНУ «НИИ КПППЗ», д-р биол. наук. E-mail: nyura\_g@mail.ru.
- Михайлова Надежда Николаевна (Mikhailova N.N.),  
зав. лаб. эксп. гигиенич. иссл. ФГБНУ «НИИ КПППЗ»,  
д-р биол. наук, проф.
- Ядыкина Татьяна Константиновна (Yadykina T.K.),  
науч. сотр. лаб. популяцион. генетики ФГБНУ «НИИ КПППЗ», канд. биол. наук.
- Алехина Дарья Александровна (Alekhina D.A.),  
аспирант лаб. эксп. гигиенич. иссл. ФГБНУ «НИИ КПППЗ».
- Горохова Лариса Геннадьевна (Gorokhova L.G.),  
ст. науч. сотр. лаб. эксп. гигиенич. иссл. ФГБНУ «НИИ КПППЗ», канд. биол. наук.
- Романенко Диана Валериевна (Romanenko D.V.),  
ст. науч. сотр. лаб. эксп. гигиенич. иссл. ФГБНУ «НИИ КПППЗ», канд. биол. наук.
- Бугаева Мария Сергеевна (Bugaeva M.S.),  
науч. сотр. научно-исслед. лаб. патанатомии ГБОУ ДПО НГИУВ Минздрава России, соискатель лаб. эксп. гигиенич. иссл. ФГБНУ «НИИ КПППЗ».