

# БИОФИЗИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ СИНТЕЗА ФТОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В ОРГАНИЗМЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Цебржинский О.И.

Украинская медицинская стоматологическая академия, Полтава

Специфические химические свойства фтора как микроэлемента и токсина ставят вопрос: образуются ли фторорганические соединения из фторид-иона в животном организме и если образуются то как?

Тропические растения *Dichapetalum cytosum* семейства маревых способны метаболизировать фторид-ион в токсичный для животных монофторацетат, который включается в цикл трикарбоновых кислот и тормозит его на уровне аконитазы (летальный синтез), образуя фторпируват и фторцитрат. Морские новозеландские губки (*Halichondria moorei*) способны накапливать до 11,5% фтора на сухой вес в виде фторсиликата натрия [3]. Фторид-ион влияет на морфогенез твердых тканей организма млекопитающих, замещая гидроксил в гидроксиапатите с образованием прочного центра кристаллизации фторапатита [1].

В повышенных дозах фторид-ион прочно связывается с ионами кальция, способствуя его входу в клетку в виде иона  $CaF^+$ , и магния, ингибируя Mg-ГТФ-азу, энтолазу, неорганическую пирофосфатазу, АТФ-азы, синтез белка. Усилением входа кальция в клетку фторид-ион активизирует кальциевую мессенджерную систему, что стимулирует дыхательный взрыв нейтрофилов. Ингибирование ГТФ-азы G-белка активизирует аденилатциклазную мессенджерную систему, что стимулирует гликолиз, липолиз, ряд антиоксидантных ферментов. Фторид-ион координирует ион меди (II) 2 типа в церулоплазмине и ион железа (III) гемовых оксидаз по лигандному месту субстрата (кислорода), что ингибирует соответствующие ферменты. В результате развивается гипокальциемия, гиперхолестеринемия, гипергликемия, системные нарушения, охарактеризованные как гиперфтороз человека [4].

Некоторые из применяемых 15 фторсодержащих лекарственных средств (содержащих трифторметил или

фтор жесткого ароматического ядра - фторотан, дексаметазон) способны дефторироваться в организме, по-видимому, с участием глутатионовой конъюгации. Ферментативным гидролизом до HF расщепляется дин-зопропилфторфосфат. In vitro с участием пероксидазы 4 молекулы пара-фторанилина окисляются перекисью водорода с конденсацией в 2-амино-5-п-фторанилинобензол-ди-п-фторанилин с потерей иона фтора [2]. Некоторые особенности гиперфтороза дают основания предполагать об образовании в организме фторглюкокортикоидов и фторурацила. Можно предполагать у растений два пути образования фторацетата. Менее вероятно реакция HF с этиленом и последующим окислением продукта. Более вероятный путь с участием микросомальных оксидаз: 18-оксиолеиновая кислота эпоксируется с участием цитохрома P-450, эпоксид с HF образует фторгидриновое производное кислоты, которое путем бета-окисления образует ацетил-CoA. У млекопитающих системы цитохрома P-450 широко распространены, а эпоксиды образуются в печени, почках, надпочечниках; имеется эпоксидгидратаза, превращающая эпоксиды в диолы, и глутатионтрансфераза, превращающая эпоксиды в глутатионовые конъюгаты. Это создает возможности ферментативного и неферментативного образования C-F связей. Однако данные о возможности синтеза фторорганических соединений в организме млекопитающихся противоречивы [1; 2] и нуждаются в уточнении. Образование эпоксидов и их преобразование эпоксидгидратазой связано с микросомальным окислением и его основным компонентом цитохромом P-450. Поэтому целью настоящей работы явилось исследование состояния цитохрома P-450 и синтеза фторорганических соединений методом изучения спектров ЭПР и ЯМР тканей печени лабораторных



Рисунок 1. Спектр F19-ЯМР дейтерио-водного (а) и хлороформ-этанольного (б) экстрактов печени морских свинок с гиперфторозом (пик - сигнал стандарта). По оси абсцисс - напряженность магнитного поля (развертка в эрстедах), по оси ординат - интенсивность сигнала.

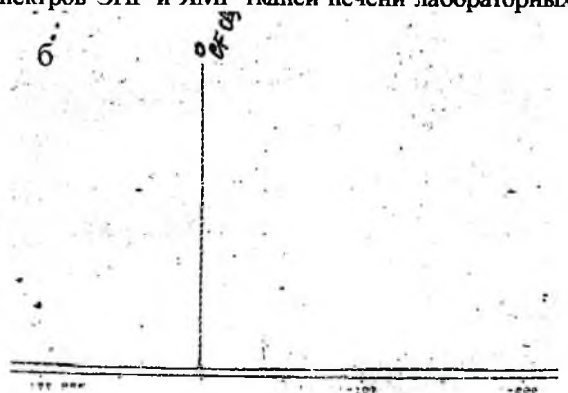


Таблица. Влияние введения фтора на интенсивность сигнала ЭПР тканей печени и почек крыс, площадь пика в см<sup>2</sup>

Фактор g	Печень		Почки	
	Норма	Гиперфтороз	Норма	Гиперфтороз
1. g=2,17-2,04; Mn(II)-содержащие белки	4,0±0,15	5,1±0,52 <0,1	3,1±0,3	2,5±0,36 >0,5
2. g=1,97; Mo(V)-содержащие белки	37,7±1,78	21,3±5,10 <0,01	5,5±0,3	3,5±0,30 <0,001
3. g=2,17; низкоспиновый Cu(II) цитохромксидазы	26,2±1,70	26,6±3,39 <0,5	12,6±1,08	14,1±0,55 >0,5
4. g=2,036; Cu(II) церулоплазмينا	18,7±1,48	11,9±2,55 <0,05	3,4±0,65	4,0±0,36 >0,5
5. g=2,03; Fe(III) негемовых нитрозильных комплексов	5,9±0,67	6,4±1,56 <0,5	6,8±0,48	7,3±0,86 >0,5
6. g=1,94; Fe(III) железосерные кластеры	107,1±3,72	102,9±8,85 <0,5	74,3±2,93	86,0±2,01 <0,001
7. g=1,91; Fe(III) цитохрома P-450	9,9±0,78	6,3±0,75 <0,01	8,3±0,59	10,5±0,53 <0,02
8. g=2,25; низкоспиновое Fe(III) цитохрома P-450	76,9±4,89	57,8±5,88 <0,05	21,4±1,72	17,4±0,68 <0,05
9. g = 2,42; низкоспиновое Fe(III) цитохрома P-450	22,6±1,21	16,7±1,36 <0,01	107,1±3,72	102,9±8,85 >0,5
10. g=2,0023; свободные R	128,9±4,15	113,0±10,1 >0,5	106,3±2,08	102,9±2,91 >0,5

животных, при гиперфторозе.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Первая серия опытов была проведена на крысах, получавших ежедневно в течение 10 дней фторид натрия в дозе 10 мг/кг массы тела. Группы нормы и гиперфтороза содержали по 7 крыс. Ткани помещаются в стандартную пресс-форму, которая хранится в жидком азоте, что дает низкотемпературную стабилизацию. Условия записи спектров мощность СВЧ - 5 мВт, магнитная индукция поля 310 мТл, развертка поля - 100 мТл, амплитуда модуляции - 0,8 мТл, постоянная времени - 0,5 сек, время развертки - 4 мин, рабочая частота 9084-9086 МГц. ЭПР-спектрометр фирмы "Varian" (E-109) дает графическую развертку сигнала, что требует измерения амплитуды ЭПР-сигнала в мм или площади пика в кв. мм (длина 1 клетки - 2 мм). Диапазон напряженности магнитного поля включал факторы g от 1,91 до 2,42 (g - фактор спектроскопического расщепления).

Вторая серия опытов была проведена на морских свинках-самцах, часть из которых ежедневно в течение 10 дней получала рег ос фторид натрия в виде водного раствора в дозе 10 мг на кг массы тела. Из тканей печени, почек, мозга, сердца, надпочечников, семенников готовили гомогенаты в тяжелой воде и в органическом растворителе (3:5 по объему хлороформ - этанол) в соотношении m:v = 1:3. Кровь смешивали с этими веществами в таких же соотношениях. Элюирование проводили встряхиванием 30 минут при 70° С. Затем центрифугировали 20 мин при 3000 g. Надосадочную жидкость подвергали F<sup>19</sup>-ядерно-магнитной резонансной (ЯМР) спектрометрии для обнаружения C-F связей. Определение проводилось на ЯМР-спектрометре "Gemini-200" фирмы "Varian"; условия - время экспозиции 24 часа при 2000-10000 сканирований относительно CFC<sub>3</sub> (фтортрихлорметан) как внутреннего стандарта.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спектры ЭПР печени крыс показали падение интенсивности сигнала от иона железа цитохрома P-450 (при факторах g = 2,42 - окисленная форма, g = 2,25 - восстановленная форма, g = 1,91 - высокоспиновая форма), меди церулоплазмينا (g = 2,036), молибдена (g = 1,97); неизменность интенсивности сигнала от нитрозильных комплексов железа (g = 2,03) и железосерных центров (g = 1,94); тенденцию к повышению интенсив-

ности сигнала от иона марганца (g = 2,04-2,17) (табл. 1). Изучение сигнала ЭПР от тканей почек показало, что интенсивность сигнала от иона Fe (III) цитохрома P-450 дисбалансирована, от иона Mo (V) - снижена, от железосерных кластеров (FeS) - повышена (табл. 1).

При исследовании спектров F<sup>19</sup>-ЯМР обнаружено, что, кроме сигнала стандарта, отсутствуют другие сигналы от дейтерио-водных и хлороформ-этанольных экстрактов крови и тканей печени, почек, мозга, сердца, надпочечников, семенников интактных и интоксцированных фторидом натрия морских свинок (рис. 1).

Представленные данные ЭПР-спектрометрии указывают на снижение содержания Mo-содержащих ферментов, церулоплазмينا, увеличение содержания железосерных белков, неизменность радикалообразования в тканях печени, что подтверждается биохимическими данными [4]. Снижено содержание окисленной формы цитохрома P-450 в печени (g = 2,42), восстановленной в печени и почках (g = 2,25), высокоспиновой формы в печени, но ее увеличение в почках (g = 1,91). Иначе, активность цитохрома P-450 в печени снижена при гиперфторозе, а в почках модулирована активность его отдельных форм. Отсутствие сигнала F<sup>19</sup>-ЯМР от разных тканей указывает на отсутствие содержания гидрофильных и гидрофобных фторорганических соединений. Иначе, в организме морских свинок не образуются фторорганические соединения с C-F связями.

Таким образом, можно полагать, что у крыс фторид угнетает активность цитохрома P-450 печени, а у морских свинок не происходит синтеза фторорганических соединений в тканях печени, почек, мозга, сердца, семенников, надпочечников, крови.

Благодарю проф. Л.М.Овсянникову (НИИ гигиены и токсикологии, Киев) и к.х.н. С.В.Иксакову (НИИ органической химии, Киев) за помощь в проведении исследований.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Авцын А.П., Жаворонков А.А. Патология флюороза. - Новосибирск: Наука, 1981. -334 с.
2. Сондерс Б. Физиологическое действие фторсодержащих соединений //Успехи химии фтора. -М.-Л.:Химия, 1964. -Т.1-2. -С.523-558.
3. Meyer M., O'Hagan D. Rare fluorinated natural products //Chem. Brit. -1992. -V.28, N9. -P.785-788.