

ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE STETINENSIS

ANNALS
OF THE POMERANIAN MEDICAL UNIVERSITY

R O C Z N I K I

POMORSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ
W SZCZECINIE
TOM LII

SUPPLEMENT 1

AKTUALNE KIERUNKI BADAŃ NAD FLUOREM
CURRENT TRENDS IN FLUORINE RESEARCH

XII SYMPOZJUM FLUOROWE
XII FLUORINE SYMPOSIUM



Annales Academiae Medicae Stetinensis – Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie ukazują się od 1951 roku. Są wydawnictwem naukowym, ciągłym, recenzowanym i cytowanym m.in. w Index Medicus (Medline), Biological Abstract, Chemical Abstract. Dostępne w ponad 150 bibliotekach krajowych i zagranicznych.

Do druku przyjmowane są prace oryginalne i poglądowe oraz prezentujące ważną kazuistykę z zakresu nauk podstawowych, klinicznych oraz humanistyki medycznej autorów z Pomorskiej Akademii Medycznej oraz z innych ośrodków w kraju i za granicą.

Zamieszczony materiał publikowany jest i będzie według przyjętego schematu wydawniczego, w języku polskim lub angielskim, z krótkimi streszczeniami odpowiednio dla języka polskiego – po angielsku, a dla języka angielskiego – po polsku. Każdy tom obejmuje 3 części stałe: oryginalne prace naukowe o objętości 1–1,5 arkusza wydawniczego, w tym skondensowane rozprawy doktorskie, doniesienia naukowe itp.; kronikę PAM za poprzedni rok wraz z przemówieniem rektora na inauguracji roku akademickiego i spis jednostek naukowo-dydaktycznych oraz bibliografię dorobku piśmienniczego uczelni.

Od tomu 50 *Roczników PAM* zostały wprowadzone zmiany w edycji, które omówiono w regulaminie publikowania prac.

REGULAMIN PUBLIKOWANIA PRAC*

w *Annales Academiae Medicae Stetinensis – Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej*

Redakcja *Annales Academiae Medicae Stetinensis – Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej* przyjmuje oryginalne prace naukowe, w trybie ciągłym. Można publikować materiały ze wszystkich dziedzin nauk medycznych, również te, które są zbyt obszerne na zamieszczenie w czasopiśmie specjalistycznych.

Materiał powinien mieć nie więcej niż 20–25 stron maszynopisu formatu A-4, łącznie z rycinami, tabelami, podpisami i piśmiennictwem tylko cytowanym w tym dziele (ograniczonymi do minimum) oraz streszczeniami.

Manuskrypt napisany w języku polskim i angielskim, na białym papierze, bez wyróżnień. Zadrukowana może być tylko pierwsza strona kartki, druga pozostaje niezadrukowana (czysta). Używać należy 12-punktowej czcionki, z zachowaniem podwójnego odstępu między wierszami. Strony numerować kolejno, zaczynając od tytułowej. Numery stron umieszczać w dolnym, prawym rogu każdej strony. Zachować kolejność układu: strona tytułowa, tekst podstawowy, materiał ilustracyjny, piśmiennictwo.

Strona tytułowa

Imię i nazwisko autora (autorów); tytuł pracy w dwóch językach; miejsce uzyskania stopnia naukowego (dotyczy doktoratów) lub pracy autora (nazwa i adres placówki naukowej, tytuł i stopień naukowy jej kierownika); słowa kluczowe w dwóch językach wymienianych w katalogu MeSH; miejsce i nazwa instytucji, gdzie wykonano pracę; szczegółowe dane dotyczące dysertacji (dotyczy prac doktorskich – promotor, liczba: stron, rycin, tabel i piśmiennictwa).

Tekst podstawowy

S u m m a r y: streszczenie pracy w języku angielskim i/lub innym. Powinno się w nim znaleźć: cel badania lub próby, podstawowe procedury (wybór badanych w doświadczeniu, metody obserwacji lub analizy), główne wyniki (istotne dane i ich statystyczne znaczenie) oraz wnioski. Należy podkreślić nowe i istotne aspekty pracy. **W s t ę p:** podać cel artykułu i podsumować uzasadnienie wykonanego badania lub obserwacji z możliwością przywołania piśmiennictwa. **M e t o d y:** opisać w sposób łatwo zrozumiały dobór materiału badawczego oraz zastosowanych metod i statystyki. **W y n i k i:** przedstawić w tekście w logicznej kolejności. Nie powtarzać danych z tabel i rycin, podkreślić i podsumować tylko ważne obserwacje. **D y s k u s j a:** podkreślić należy nowe oraz ważne aspekty badania i wynikające z nich wnioski, nie powtarzać szczegółowo danych przedstawionych w rozdziałach Wstęp i Wyniki. Porównać własne obserwacje z innymi autorami, którzy wykonali zbliżone badania. **W n i o s k i:** powiązać z celami badania i przedstawić w sposób zwięzły. **S t r e s z c z e n i e s t r u k t u r a l n e** (wstęp, materiał i metody, wyniki, konkluzje): w języku podstawowym pracy, zawierające kwintesencję tego, co jest w tekście, od 200 do 250 słów. **S k r ó t y** użyte w tekście po raz pierwszy należy podać w pełnym brzmieniu. Nie należy rozpoczynać zdania od skrótu. **L i c z b o w e w a r t o ś c i i s y m b o l e** wszystkich wielkości winny być podane wg międzynarodowego układu jednostek SI. **S ł o w a k l u c z o w e:** 3–6 terminów, nie powinny powtarzać słów zawartych w tytule pracy, wymienianych w katalogu MeSH.

Materiał ilustracyjny

Obejmuje ryciny (kreski – wykresy, diagramy oraz siatki – zdjęcia), tabele, tablice, opatrzone tytułami (pod rycinami, nad tabelami). Powinny być dostarczone na oddzielnych kartkach, z oznaczeniem góra–dół i kolejności numeracji wg cytowania w tekście. Osobną numerację posiadają ryciny i osobną tabele. Fotografie mikroskopowe powinny posiadać wewnętrzną skalę, a stosowane symbole, strzałki lub litery – wyraźnie uwidocznione na tle. Kolorów używać tylko wtedy, jeśli barwa czarno-biała nie odda istoty przekazu. Tytuły oraz inne informacje wewnętrzne na rycinach i w tabelach należy podać w języku polskim i angielskim. Na marginesie maszynopisu zaznaczyć numery tabel i rycin w miejscu, gdzie mają być wstawione.

Piśmiennictwo

Numerując, należy podawać w kolejności cytowania. Każdy numer piśmiennictwa należy zapisywać od nowej linii. Pozycji nie należy dublować. Cytowane w tekście piśmiennictwo podać w nawiasach kwadratowych, ze spacją między numerami. Podajemy nazwisko autora/-ów z pierwszymi literami imion. Przytaczamy wszystkich autorów, jeśli jest ich sześciu. Powyżej tej liczby – sześciu z dopiskiem *et al.* Tytuły periodyków powinny być skracane zgodnie ze sposobem przyjętym w Index Medicus (Medline).

Redakcja wymaga przedłożenia pracy w dwóch egzemplarzach wraz z wersją elektroniczną (dyskietka lub CD-ROM) z zaznaczeniem programu zapisu. Tekst powinien być zapisany w programie Word.

* Opracowany na podstawie wytycznych Międzynarodowego Komitetu Wydawców Czasopism Medycznych, opublikowanych w *Problemach Medycyny Nuklearnej* 1997, 11 (21), 67–87.

ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE STETINENSIS

ANNALS
OF THE POMERANIAN MEDICAL UNIVERSITY

ROCZNIKI

POMORSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ
W SZCZECINIE
TOM LII

SUPPLEMENT 1

AKTUALNE KIERUNKI BADAŃ NAD FLUOREM
CURRENT TRENDS IN FLUORINE RESEARCH

XII SYMPOZJUM FLUOROWE
XII FLUORINE SYMPOSIUM



Redaktor naczelny
Editor-in-Chief
prof. dr hab. n. med. IRENEUSZ KOJDER

Redaktor naukowy
Scientific editor
prof. dr hab. n. med. *Dariusz Chlubek*

Międzynarodowa Rada Naukowa
International Scientific Council
Prof. Dr. *Raymond Ardaillou* (Paryż, F), prof. dr hab. n. med. *Andrzej Cretti*,
Prof. Dr. *Antonio J.G. Ferreira* (Lizbona, P), prof. dr hab. n. med. *Janusz Fydryk*,
Prof. Dr. *Alan Gewirtz* (Filadelfia, USA), Prof. Dr. *Yücel Kanpolat* (Ankara, TR),
prof. dr hab. n. med. *Irena Karłowska*, Prof. Dr. *Koichi Kono* (Osaka, J),
prof. dr hab. n. med. *Ireneusz Kojder*, prof. dr hab. n. med. *Tadeusz Marcinkowski*,
Prof. Dr. *Falk Oppel* (Bielefeld, D), Prof. Dr. *Mary Osborn* (Getynga, D),
prof. dr hab. n. med. *Andrzej Paradowski*, Prof. Dr. *Wolfgang Straube* (Rostok, D),
prof. dr hab. n. med. *Eugeniusz Szmatoch*

Komitet redakcyjny
Editorial committee
prof. dr hab. n. med. *Dariusz Chlubek*, prof. dr hab. n. med. *Maria Jastrzębska*,
prof. dr hab. n. med. *Krzyszyna Pilarska*, prof. dr hab. n. med. *Maria Syryńska*,
prof. dr hab. n. med. *Andrzej Żyłuk*, dr hab. n. med. *Aleksandra Kładna*, dr hab. n. med. *Anna Machoy-Mokrzyńska*,
dr hab. n. med. *Alicja Walczak*, mgr *Dagmara Budek*, mgr *Bożena Gottschling*

Tłumacz redakcji
Editorial translator
dr n. med. *Tomasz Dutkiewicz*

Redakcja techniczna i korekta
Technical editor and proofreader
Bożena Gottschling
Elżbieta Przerwa
Ryszard Sędkiewicz

© Copyright by Pomorska Akademia Medyczna, 2006

Adres redakcji
Editorial office address
Pomorska Akademia Medyczna
70-204 Szczecin, ul. Rybacka 1
www.ams.edu.pl
wydawnictwo@pam.szczecin.pl

SPIS TREŚCI

	<i>Dariusz Chlubek, Zygmunt Machoy</i> Przedmowa	5
1.	<i>Niloufer J. Chinoy</i> Wprowadzenie do XII Sympozjum Fluorowego w Szczecinie	7
2.	<i>Ewa Dąbrowska, Maria Balunowska, Rafał Letko</i> Badania histoenzymatyczne wątroby i ślinianki podżuchwowej szczurów ekspozowanych na fluorek sodu w wodzie do picia	9
3.	<i>Igor Dzidziul, Izabela Gutowska, Iwona Noceń, Dariusz Chlubek</i> Porównanie zawartości fluorków w powierzchniowych warstwach szkliwa zębów mlecznych i stałych – badania in vitro	17
4.	<i>Magdalena Gąssowska, Barbara Dołęgowska, Dariusz Chlubek</i> Wpływ jonów fluorkowych na aktywność wymiennicza sodowo-protonowego płytek krwi – doniesienie wstępne	21
5.	<i>Katarzyna Grocholewicz, Iwona Noceń, Izabela Gutowska</i> Wpływ nawyków higieniczno-zdrowotnych na zawartość wybranych jonów w ślinie kobiet po menopauzie	25
6.	<i>Katarzyna Grocholewicz, Elżbieta Weyna, Izabela Gutowska, Iwona Noceń</i> Skład mineralny szkliwa zębów a głębokość biopsji i stan uzębienia kobiet w wieku pomenopauzalnym	31
7.	<i>Ewa Grucka-Mamczar, Dariusz Chlubek, Ewa Birkner, Jolanta Zalejska-Fiolka, Iwona Błaszczuk, Sławomir Kasperczyk, Barbara Stawiarska-Pięta</i> Wpływ kofeiny i fluorku sodu na stężenie fluorków w surowicy krwi i ich zawartość w zębach i kościach szczurów	37
8.	<i>Maria Jezierska-Madziar, Piotr Pińskwar, Janusz Golski</i> Kumulacja fluoru w matach glonów nitkowatych (<i>Chlorophyta</i>) z ekosystemu wodnego o podwyższonej koncentracji fluorków	41
9.	<i>Urszula Kaczmarek, Beata Pregiel, Alina Wrzyszczyk-Kowalczyk, Iwona Grzesiak, Katarzyna Fita</i> Poziom fluoru w ślinie po szczotkowaniu zębów pastami fluorkowymi z i bez płukania wodą.	45
10.	<i>Dariusz Kłódka, Helena Zakrzewska</i> Wykorzystanie sorpcyjnych właściwości kości do obniżenia ponadoptimalnych stężeń fluorków w wodzie	51
11.	<i>Piotr Kosior, Urszula Kaczmarek</i> Długoterminowe uwalnianie jonów fluorkowych z wybranych cementów szkło-jonomerowych – badania in vitro	57
12.	<i>Piotr Kosior, Urszula Kaczmarek</i> Krótkoterminowe uwalnianie jonów fluorkowych z laku szczelinowego Con Seal F do różnych środowisk – badania in vitro	61
13.	<i>Anna Lubkowska, Dariusz Chlubek, Anna Machoy-Mokrzyńska</i> Wpływ naprzemiennego podawania chlorku glinu i fluorku sodu w wodzie pitnej na stężenie fluorków w surowicy i ich kumulację w kościach szczurów	67
14.	<i>Anna Machoy-Mokrzyńska, Zygmunt Machoy</i> Aktualne kierunki badań nad fluorem	73
15.	<i>Tamara Pawlaczek-Kamińska, Maria Borysewicz-Lewicka, Karol Józwiak</i> Badania zawartości fluorków w próbkach naddziąsłowego kamienia nazębnego metodą mikroanalizy rentgenowskiej	79
16.	<i>Sylwia Piotrowska, Zygmunt Machoy, Dariusz Chlubek</i> Porównanie zawartości wapnia, magnezu, fluorków i fosforu w porożach i kościach czaszek saren (<i>Capreolus capreolus</i>) w zależności od wieku.	83
17.	<i>Wiesław Salicki, Elżbieta Kalisińska</i> Stężenia fluoru i wapnia w kościach grzywacza z okolic Szczecina w latach 2002–2004.	89
18.	<i>Barbara Stawiarska-Pięta, Ewa Grucka-Mamczar, Rafał Stojko, Ewa Birkner, Jolanta Zalejska-Fiolka</i> Wpływ fluorku sodu i kofeiny na stężenie wapnia, fosforu i magnezu w surowicy krwi szczurów.	97
19.	<i>Anna Szyperka, Zygmunt Machoy, Bogusław Machaliński</i> Oddziaływanie kompleksów glinowo-fluorkowych (AlF _x) na związki wysokoenergetyczne (ADP, ATP) oceniane przy zastosowaniu modelowania molekularnego	103
20.	<i>Helena Zakrzewska, Jan Udała</i> Wpływ fluorku sodu na zawartość ATP w nasieniu tryka w badaniach in vitro.	109

CONTENTS

<i>Dariusz Chlubek, Zygmunt Machoy</i>	
Preface	5
1. <i>Niloufer J. Chinoy</i>	
Introduction to the XII Fluorine Symposium in Szczecin, Poland	7
2. <i>Ewa Dąbrowska, Maria Balunowska, Rafał Letko</i>	
Histoenzymatic study of the liver and submandibular gland of rats exposed to sodium fluoride in drinking water	9
3. <i>Igor Dzdziul, Izabela Gutowska, Iwona Nocoń, Dariusz Chlubek</i>	
Fluoride content in superficial enamel layers of deciduous and permanent teeth – an in vitro study	17
4. <i>Magdalena Gąssowska, Barbara Dołęgowska, Dariusz Chlubek</i>	
The effect of fluoride ions on the activity of the platelet sodium-proton exchanger: a preliminary report	21
5. <i>Katarzyna Grocholewicz, Iwona Nocoń, Izabela Gutowska</i>	
The influence of hygiene and health habits on the concentration of some ions in saliva of postmenopausal women	25
6. <i>Katarzyna Grocholewicz, Elżbieta Weyna, Izabela Gutowska, Iwona Nocoń</i>	
Mineral content of enamel, depth of biopsy, and dentition status in postmenopausal women.	31
7. <i>Ewa Grucka-Mamczar, Dariusz Chlubek, Ewa Birkner, Jolanta Zalejska-Fiolka, Iwona Błaszczyk, Sławomir Kasperczyk, Barbara Stawiarska-Pięta</i>	
The effect of caffeine and sodium fluoride on fluoride concentration in serum and its content in teeth and bones of rats	37
8. <i>Maria Jezierska-Madziar, Piotr Pińskwar, Janusz Golski</i>	
Accumulation of fluorine by filiform algae (<i>Chlorophyta</i>) agglomerations in an aqueous ecosystem with increased fluoride content	41
9. <i>Urszula Kaczmarek, Beata Pregiel, Alina Wrzyszczyk-Kowalczyk, Iwona Grzesiak, Katarzyna Fita</i>	
Fluoride levels in saliva after tooth-brushing using fluoride toothpastes with and without rinsing of oral cavity	45
10. <i>Dariusz Klódka, Helena Zakrzewska</i>	
The use of sorptive properties of bone for reducing supraoptimal concentrations of fluorides in water	51
11. <i>Piotr Kosior, Urszula Kaczmarek</i>	
Long term release of fluoride from selected glass-ionomer cements – an in vitro study	57
12. <i>Piotr Kosior, Urszula Kaczmarek</i>	
Short-term fluoride release from Conseal F fissure sealant in some media – an in vitro study	61
13. <i>Anna Lubkowska, Dariusz Chlubek, Anna Machoy-Mokrzyńska</i>	
The effect of alternating administration of aluminum chloride and sodium fluoride in drinking water on the concentration of fluoride in serum and its content in bones of rats	67
14. <i>Anna Machoy-Mokrzyńska, Zygmunt Machoy</i>	
Current trends in fluorine research	73
15. <i>Tamara Pawlaczyk-Kamińska, Maria Borysewicz-Lewicka, Karol Józwiak</i>	
Fluoride content in supragingival dental calculus measured with x-ray microanalysis	79
16. <i>Sylwia Piotrowska, Zygmunt Machoy, Dariusz Chlubek</i>	
Calcium, magnesium, fluoride, and phosphorus content in antlers and skull bones of roe deer (<i>Capreolus capreolus</i>) in relation to age	83
17. <i>Wiesław Salicki, Elżbieta Kalisińska</i>	
Fluorine and calcium concentrations in bones of the wood pigeon from the environs of Szczecin: a 2002–2004 study	89
18. <i>Barbara Stawiarska-Pięta, Ewa Grucka-Mamczar, Rafał Stojko, Ewa Birkner, Jolanta Zalejska-Fiolka</i>	
The effect of sodium fluoride and caffeine on concentrations of calcium, phosphorus and magnesium in rat serum	97
19. <i>Anna Szyperska, Zygmunt Machoy, Bogusław Machaliński</i>	
Interactions of aluminofluoride complexes (AlF _x) with high-energy compounds (ADP, ATP) as revealed by molecular modeling	103
20. <i>Helena Zakrzewska, Jan Udała</i>	
In vitro influence of sodium fluoride on adenosine triphosphate (ATP) content in ram semen	109

PRZEDMOWA

Szanowni Państwo,

Szczecin po raz dwunasty gości uczestników sympozjum fluorowego. Jako organizatorzy, mamy ogromną przyjemność i zaszczyt powitać Państwa w stolicy Pomorza Zachodniego. Nie ukrywamy przy tym satysfakcji z faktu, iż na przestrzeni ostatniego ćwierćwiecza udało się nam zorganizować 11 ogólnopolskich spotkań, z których każde cieszyło się nieprzeciętnym zainteresowaniem. Mamy nadzieję, że tak będzie i tym razem.

Dzięki integrującej roli szczecińskich sympozjów powstało w Polsce prężne, liczące się w świecie środowisko naukowe zajmujące się badaniami nad fluorem we wszystkich niemal aspektach jego oddziaływania na organizmy żywe. Potwierdzeniem tego są nie tylko liczne publikacje ukazujące się stale w czasopismach umieszczonych na tzw. liście filadelfijskiej, ale także udział naszych przedstawicieli we władzach International Society for Fluoride Research (ISFR).

Nie zorganizowaliśmy się, co prawda, w towarzystwie posiadającym osobowość prawną, ale wielu z nas aktywnie uczestniczy w światowych konferencjach ISFR. Bieżący rok przyniósł tej organizacji niepowetowaną stratę. Odeszła na zawsze prof. Niloufer J. Chinoy, prezydent ISFR wybrana na tę funkcję podczas ubiegłorocznej, XXVII Światowej Konferencji towarzystwa w niemieckim Wiesbaden. Była znakomitym naukowcem, wybitnym znawcą tematyki fluorowej, a zarazem skromną, pełną ciepła, serdecznie uśmiechniętą kobietą. Na prośbę prof. Zygmunta Machoya uczyniła zadość naszej tradycji pisząc wprowadzenie do obecnego – XII Sympozjum. Zdążyła tuż przed śmiercią, która odebrała Ją nam 8 maja 2006 roku. Jej pamięci pragniemy poświęcić nasze spotkanie i jego owoce.

prof. dr hab. n. med. *Dariusz Chlubek*
prof. dr hab. n. med. *Zygmunt Machoy*

NILOUFER J. CHINYO

INTRODUCTION TO THE XII FLUORINE SYMPOSIUM IN SZCZECIN, POLAND

Department of Zoology, Gujarat University, Ahmedabad, India
President of the International Society for Fluoride Research

It is a great honour for me to write an Introduction on the occasion of the XII National Fluoride Symposium to be held in October, 2006 at Biochemistry Department, Szczecin, Poland.

At this juncture, I would like to extend my heartiest congratulations to Professor Zygmunt Machoy and his very active and dedicated coworkers who over the years have produced some excellent data on fluoride effects in animals and humans. They have been also successful in arranging National level symposia regularly. Some of their findings have far reaching consequences and will help to solve some of the problems regarding fluoride toxicity which are hitherto unknown.

I wish to send my greetings to the organizers and all the participants to make the symposium a grand success.

EWA DĄBROWSKA, MARIA BALUNOWSKA, RAFAŁ LETKO

BADANIA HISTOENZYMATYCZNE WĄTROBY I ŚLINIANKI PODŻUCHWOWEJ SZCZURÓW EKSPONOWANYCH NA FLUOREK SODU W WODZIE DO PICIA

HISTOENZYMATIC STUDY OF THE LIVER AND SUBMANDIBULAR GLAND OF RATS EXPOSED TO SODIUM FLUORIDE IN DRINKING WATER

Zakład Stomatologii Społecznej i Profilaktyki Akademii Medycznej w Białymstoku
ul. Akademicka 3, 15-089 Białystok
Kierownik: dr n. med. Ewa Dąbrowska

Summary

Purpose: Universal use of fluorine compounds in dentistry, as well as industrial and civilization-related exposures may produce undesirable effects of fluorine action. The effects of fluoride ions depend on the dose and exposure time. Some may be positive, e.g. in caries prevention, while others are harmful when optimal prophylactic or therapeutic doses have been surpassed. The literature is replete with reports on interactions of fluoride ions with the activity of many enzymes and indirectly with cellular metabolism.

Material and methods: The paper presents the results of a histoenzymatic study of the liver and submandibular gland of young rats exposed to NaF administered in drinking water. The intensity of staining for lactate dehydrogenase, succinate dehydrogenase, acid and alkaline phosphatase was evaluated.

Results: The reaction to succinate dehydrogenase in the submandibular gland and lactate dehydrogenase in hepatocytes was attenuated, while the reaction to acid phosphatase was enhanced in the liver when rats were exposed to 32.0 mg NaF/dm³ of drinking water.

K e y w o r d s: natrium fluoride – histoenzymatic studies – liver – submandibular gland – rats.

być przyczyną powstawania niekorzystnych skutków nadmiernego narażenia na fluor. Efekty działania jonu fluorokowego są zależne od dawki i czasu ekspozycji. Mogą one być pozytywne, np. w profilaktyce próchnicy lub szkodliwe, w przypadku przekroczenia optymalnej dawki profilaktycznej lub terapeutycznej. W literaturze można odnaleźć liczne publikacje na temat wpływu jonów fluoru na aktywność bardzo wielu enzymów i pośrednio – na metabolizm komórkowy.

Material i metody: W pracy przedstawiono wyniki badań histoenzymatycznych wątroby i ślinianki podżuchwowej młodych szczurów narażonych na NaF podawany w wodzie pitnej. Oceniano nasilenie odczynów na dehydrogenazę mleczanową, dehydrogenazę bursztynianową, fosfatazę kwaśną i zasadową.

Wyniki: Na podstawie badań zauważono osłabienie odczynu na dehydrogenazę bursztynianową w śliniance podżuchwowej, osłabienie odczynu na dehydrogenazę mleczanową w komórkach wątroby oraz zwiększenie odczynu na fosfatazę kwaśną w wątrobie szczurów, przy narażeniu na stężenie 32,0 mg NaF/dm³ w wodzie do picia.

H a s ł a: fluorok sodu – badania histoenzymatyczne – wątroba – ślinianka podżuchwowa – szczury.

Streszczenie

Wstęp: Powszechne stosowanie związków fluoru w stomatologii, ekspozycje przemysłowe i cywilizacyjne, mogą

Wstęp

Wyraźny spadek próchnicy obserwowany w świecie przypisuje się miejscowemu stosowaniu związków fluoru, głównie w pastach do zębów. Związki fluoru hamują de-

mineralizację i zwiększają remineralizację początkowych uszkodzeń szkliwa oraz ograniczają metabolizm bakterii płytki nazębnej, poprzez inhibicje enzymatyczne, np. enolazy, enzymu istotnego w przemianie węglowodanów.

Fluor, obok ustalonego efektu kariostatycznego, może stanowić pewne ryzyko dla organizmów, jeśli narażone są one na duże dawki w sposób ostry lub mniejsze stosowane przewlekłe. Poznanie mechanizmów przemian fluoru w organizmie pozwala na określenie możliwego ryzyka nadmiernej ekspozycji na jego związki. Fluor w przewlekłym zatruciu może upośledzać funkcje metaboliczne komórek i tkanek. Wpływa on na aktywność około 72 enzymów, głównie oksydoreduktaz, transferaz i hydrolaz, zaburza cykl Krebsa, wytwarzanie ATP, hamuje syntezę białek i DNA [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12]. Większość badaczy zajmuje się przewlekłą toksycznością związków fluoru w odniesieniu do zmian w obrębie zębów i kości, wskazuje na gromadzenie się go w tkankach zwapniałych. Oddziaływanie jonów fluoru na tkanki miękkie budzi wiele kontrowersji. Większość autorów stwierdza, że fluor po wchłonięciu do krwiobiegu dyfunduje do tkanek miękkich, powodując przejściowy wzrost jego zawartości. Poziom jonów fluoru w tych tkankach maleje, gdyż tkanki te nie wiążą go [13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20]. Jednak przy częstym lub stałym dopływie mogą być nimi nasyrane [3, 21, 22, 23, 24]. *Zaworonkow* [24] na podstawie przeglądu piśmiennictwa omawia zaburzenia metaboliczne, czynnościowe i morfologiczne w wielu tkankach i organach, np. w wątrobie, nerkach, OUN, mięśniach. Zmiany te łączono z zaburzeniami metabolizmu związanymi z oddziaływaniem jonów fluoru na wiele enzymów. Wpływ związków fluoru na metabolizm tkanek miękkich jest oceniany najczęściej w nerkach oraz w wątrobie [1, 13, 21, 25, 26, 27, 28, 29, 30].

Celem pracy była ocena wpływu podawanego z wodą do picia fluorku sodu na obraz histoenzymatyczny wątroby i ślinianki podżuchwowej szczurów.

Material i metody

Doświadczenie przeprowadzono na szczurach szczepu Wistar. Samice szczura podzielono na 3 grupy: kontrolną i 2 grupy badane. Samice grup badanych otrzymywały w wodzie pitnej fluorek sodu w stężeniu 10,6 mg NaF/L (grupa I) oraz 32 mg NaF/L (grupa II). Grupa kontrolna otrzymywała do picia wodę wodociągową o minimalnej zawartości fluoru. Po okresie 2 tygodni nastąpiło pokrycie samic, które przez okres ciąży oraz karmienia otrzymywały NaF w dawce zależnej od grupy. Potomstwo po odstawieniu od matek także otrzymywało fluorek sodu w dwóch w/w stężeniach. Zwierzęta karmione były standardową paszą granulowaną i przebywały w standardowych warunkach środowiskowych. Wątrobę i śliniankę podżuchwową pobierano do badań od potomstwa w 14., 30., 60. i 90. dniu życia zwierząt oraz po 30 dniach od zaprzestania podawania NaF, czyli w 120. dniu życia. Do badań użyto 75 szczurów: po 5 w każdej grupie.

Materiał do oznaczeń histoenzymatycznych natychmiast po pobraniu zamrażano przy użyciu Tissue-Tek OCT i krojono w kriostacie. Wykonano odczyny na aktywność dehydrogenazy mleczanowej według Jacobsa (w wątrobie), dehydrogenazy bursztynianowej według Nachlasy i Seligmana (w śliniance podżuchwowej) oraz na aktywność fosfatazy kwaśnej i zasadowej według Gomoriego. Nasilenie odczynów reakcji histochemicznych określano według skali: (-) odczyn ujemny, (+) odczyn słabo dodatni, (++) odczyn dodatni, (+++) odczyn silnie dodatni.

Wyniki

Badania histoenzymatyczne wątroby (dehydrogenaza mleczanowa, fosfataza kwaśna)

Dehydrogenaza mleczanowa

Grupa kontrolna

Odczyn na aktywność dehydrogenazy mleczanowej w wątrobach szczurów grupy kontrolnej we wszystkich przedziałach wiekowych był widoczny w postaci drobnych, zlewających się dodatnich ziarnistości w strefie środkowej i pośredniej zrazika (++) , a silnie dodatni (+++) w strefie obwodowej

Grupa I (10,6mgNaF/dm³)

W grupie I, o mniejszym narażeniu na NaF, u zwierząt 14-dniowych odczyn na aktywność dehydrogenazy mleczanowej był podobny, jak u zwierząt grupy kontrolnej. U zwierząt tej grupy, w 30. i 60. dniu życia, część komórek strefy środkowej zrazika wykazywała odczyn silnie dodatni (+++), strefy pośredniej dodatni (++) , a obwodowej dodatni i silnie dodatni (++)/+++). Po zaprzestaniu podawania NaF, nasilenie reakcji histoenzymatycznej było podobne jak w grupie kontrolnej.

Grupa II (32,0mg NaF/dm³)

W grupie II, o większym narażeniu na NaF, w wątrobach zwierząt 14-dniowych zaznaczał się wzrost nasilenia odczynu w strefie środkowej do silnie dodatniego (+++) i częściowo pośredniej (odczyn dodatni i silnie dodatni) (++)/+++). Po 30 dniach w strefie środkowej i pośredniej zrazika był dodatni i słabo dodatni (++)/+, w strefie obwodowej silnie dodatni (+++). Po 60 i 90 dniach następował wyraźny spadek nasilenia odczynu na dehydrogenazę mleczanową we wszystkich strefach zrazika wątroby. W 120. dniu, czyli 30 dni po zaprzestaniu podawania NaF, odczyn był nierównomierny.

Fosfataza kwaśna

Grupa kontrolna

Reakcja na fosfatazę kwaśną w grupie kontrolnej zwierząt 14-dniowych była dodatnia (++) w wątrobach

wszystkich zwierząt, jednakowo nasiloną we wszystkich strefach zrazika. W komórkach Browicza–Kupffera reakcja ta miała największe nasilenie. Ziarnistości małej i średniej wielkości były zlokalizowane w cytoplazmie hepatocytów najczęściej przy błonie komórkowej. Podobny obraz obserwowano w preparatach wątrób 30-, 60-, 90- i 120-dniowych zwierząt (ryc. 1).

Grupa I (10,6mg NaF/dm³)

W grupie I, podobnie jak u zwierząt kontrolnych, u szczurów 14-dniowych odczyn na fosfatazę kwaśną był dodatni (++), a u zwierząt 30-dniowych w kilku polach widzenia silnie dodatni (+++) (ryc. 2). Nasilenie reakcji utrzymywało się również w wątróbach szczurów 60- i 90-dniowych tej grupy. Po zaprzestaniu podawania NaF, czyli w 120. dniu życia nasilenie odczynu w wątróbach badanych zwierząt nieco osłabło.

Grupa II (32,0 mgNaF/dm³)

Reakcja na fosfatazę kwaśną, podobnie jak w grupie I wykazywała tendencję do nasilenia. W 30. dniu życia odczyn na fosfatazę kwaśną był silnie dodatni (+++) we wszystkich częściach zrazików (ryc. 3). Rozmieszczenie ziarnistości było chaotyczne, takie jak w uszkodzonej strukturze wątroby. Konglomeraty tych ziarnistości obserwowano w wątróbach zwierząt 60- i 90-dniowych tej grupy. Pomimo odstawienia NaF, w wątróbach 120-dniowych zwierząt nasilenie reakcji na fosfatazę kwaśną się utrzymywało.

Odczyn histoenzymatyczny na fosfatazę zasadową w komórkach wątroby był ujemny lub śladowy we wszystkich grupach badanych i w grupie kontrolnej, dlatego nie uwzględniono tego badania w analizie wyników przeprowadzonego doświadczenia.

Badania histoenzymatyczne ślinianki podżuchwowej (dehydrogenaza bursztynianowa, fosfataza alkaliczna)

Grupa kontrolna

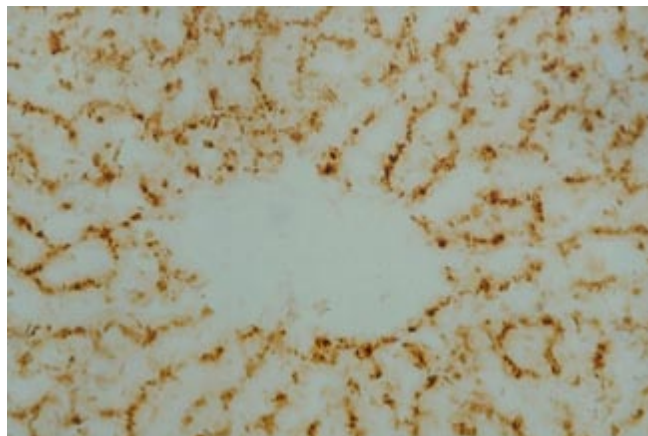
Odczyn histoenzymatyczny na dehydrogenazę bursztynianową w poszczególnych elementach strukturalnych ślinianki podżuchwowej szczura był zróżnicowany. W grupach kontrolnych, niezależnie od wieku zwierzęcia, odczyn ten ujawniał się jako ziarnisty, a jego nasilenie oceniono jako dodatnie (++) w komórkach pęcherzykowych i komórkach kanalików ziarnistych oraz silnie dodatnie (+++) w komórkach kanalików prążkowanych.

Grupa I (10,6mgNaF/dm³)

Odczyn na dehydrogenazę bursztynianową w I grupie badanej wyglądał podobnie jak w grupie kontrolnej. Dotyczyło to ślinianek pobieranych od zwierząt we wszystkich grupach wiekowych (ryc. 4, 5).

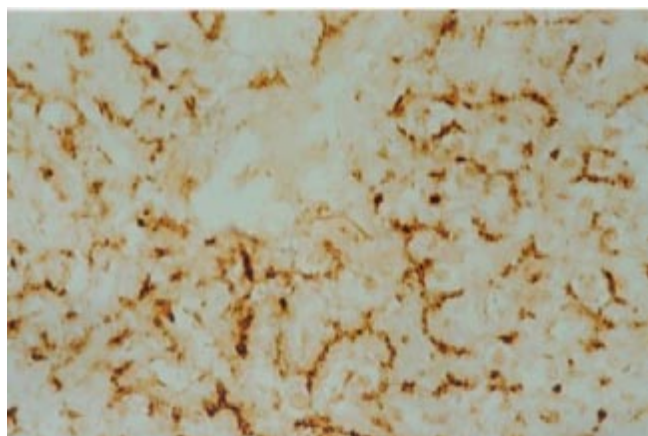
Grupa II (32,0mgNaF/dm³)

Analizując nasilenie reakcji histoenzymatycznej na dehydrogenazę bursztynianową w grupie zwierząt otrzymu-



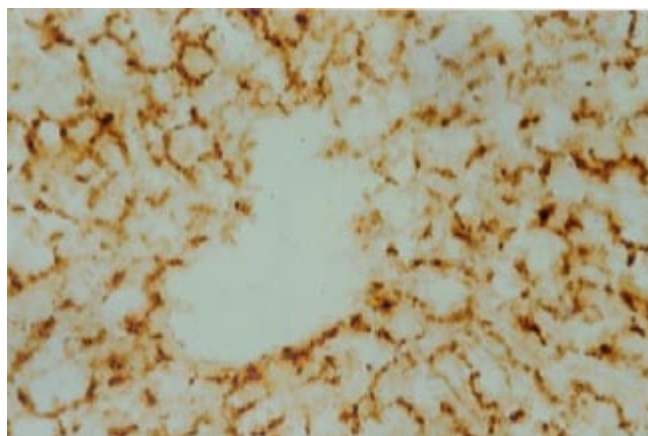
Ryc. 1. Wycinek wątroby 30-dniowego szczura z grupy kontrolnej. Odczyn na fosfatazę kwaśną dodatni. Powiększenie $\times 400$

Fig. 1. Liver section of a 30-day-old rat from the control group. Reaction to acid phosphatase positive. Magn. $400\times$



Ryc. 2. Wycinek wątroby 30-dniowego szczura z I grupy badanej. Odczyn na fosfatazę kwaśną dodatni, miejscowo silnie dodatni. Powiększenie $\times 400$

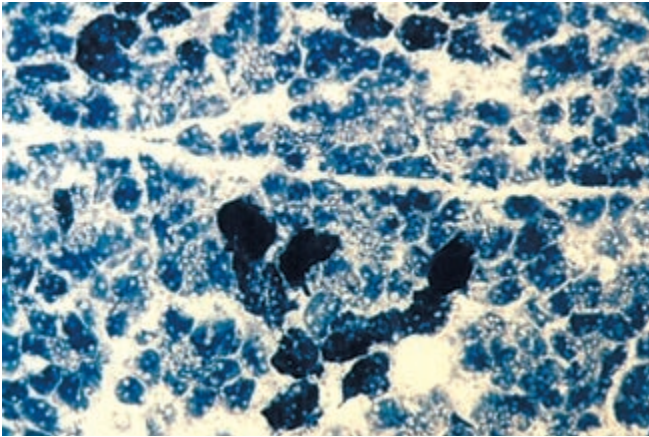
Fig. 2. Liver section of a 30-day-old rat from study group I. Reaction to acid phosphatase positive, locally intense. Magn. $400\times$



Ryc. 3. Wycinek wątroby 30-dniowego szczura z II grupy badanej. Odczyn na fosfatazę kwaśną silnie dodatni we wszystkich częściach zrazików. Powiększenie $\times 400$

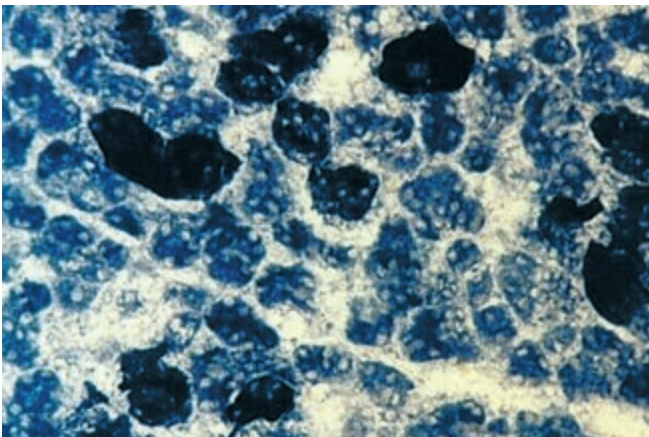
Fig. 3. Liver section of a 30-day-old rat from study group II. Reaction to acid phosphatase intense in all parts of the lobules. Magn. $400\times$

jącej większą dawkę NaF (II grupa badana) stwierdzono, że w podgrupach wiekowych 14- i 30- dniowych obraz nie różnił się zasadniczo w stosunku do grupy kontrolnej. Preparaty histoenzymatyczne wykonane ze ślinianek zwierząt



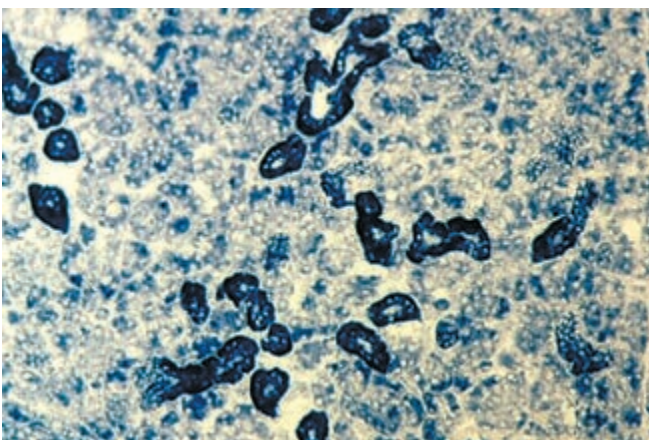
Ryc. 4. Odczyn histoenzymatyczny na dehydrogenazę bursztynianową ślinianki podżuchwowej: dodatni w komórkach wydzielniczych i silnie dodatni w kanalikach prążkowanych. Grupa kontrolna, 30 dni, $\times 250$

Fig. 4. Histoenzymatic reaction to succinate dehydrogenase in the submandibular gland. Moderate staining in secretory cells and intense in striated ducts. Control group, 30 days, $250\times$



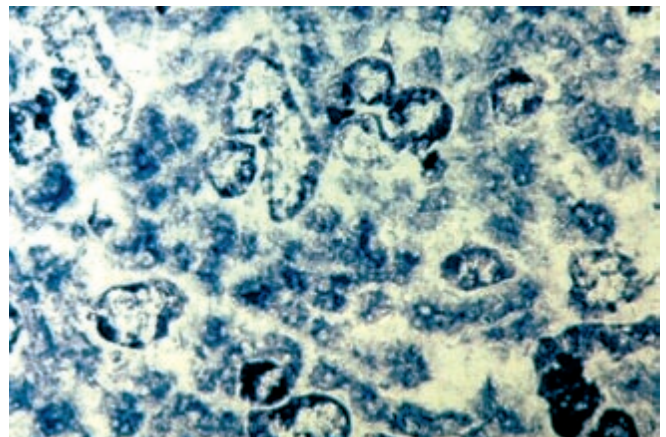
Ryc. 5. Odczyn histoenzymatyczny na dehydrogenazę bursztynianową ślinianki podżuchwowej: dodatni w komórkach wydzielniczych i silnie dodatni w kanalikach prążkowanych. Grupa kontrolna, 90 dni, $\times 400$

Fig. 5. Histoenzymatic reaction to succinate dehydrogenase in the submandibular gland. Moderate staining in secretory cells and intense in striated ducts. Control group, 90 days, $400\times$



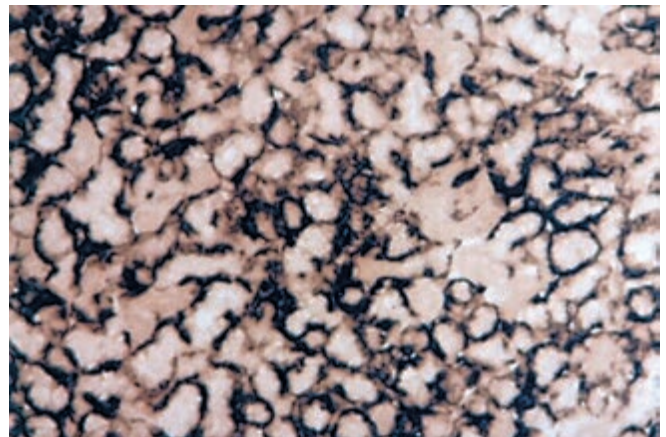
Ryc. 6. Znacznie osłabiony odczyn histoenzymatyczny na dehydrogenazę bursztynianową ślinianki podżuchwowej. Grupa II, 60 dni, $\times 250$

Fig. 6. Markedly reduced histoenzymatic reaction to succinate dehydrogenase in the submandibular gland. Group II, 60 days, $250\times$



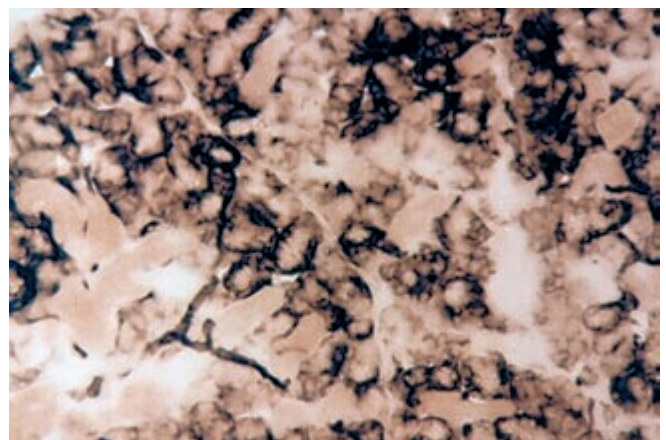
Ryc. 7. Nierównomiernie osłabiony odczyn histoenzymatyczny na dehydrogenazę bursztynianową ślinianki podżuchwowej. Grupa II, 30 dni po odstawieniu NaF, $\times 400$

Fig. 7. Varying reduction in the histoenzymatic reaction to succinate dehydrogenase in the submandibular gland. Group II, 30 days after withdrawal of NaF, $400\times$



Ryc. 8. Dodatni odczyn histoenzymatyczny na fosfatazę zasadową w komórkach mioepitelialnych, ujemny w obrębie przewodów ślinianki podżuchwowej. Grupa kontrolna, 30 dni, $\times 250$

Fig. 8. Positive histoenzymatic reaction to alkaline phosphatase in myoepithelial cells, negative in ducts of the submandibular gland. Control group, 30 days, $250\times$



Ryc. 9. Dodatni odczyn histoenzymatyczny na fosfatazę zasadową w komórkach mioepitelialnych i ścianach naczyń krwionośnych ślinianki podżuchwowej, ujemny w obrębie przewodów. Grupa II, 90 dni, $\times 250$

Fig. 9. Positive histoenzymatic reaction to alkaline phosphatase in myoepithelial cells and vascular wall, negative reaction in ducts of the submandibular gland. Group II, 90 days, $250\times$

II grupy otrzymujących NaF do 60. i 90. dnia życia wykazały osłabienie odczynu na dehydrogenazę bursztynianową. Dotyczyło to zarówno pęcherzyków, gdzie odczyn był słabo dodatni (+) oraz przewodów, gdzie był on dodatni (++) (ryc. 6). Podobny obraz odczynu histoenzymatycznego otrzymano w grupach zwierząt 120-dniowych, którym zaprzestano podawania fluorku sodu (ryc. 7).

Odczyn histoenzymatyczny na fosfatazę zasadową był zlokalizowany w miejscach występowania komórek mioepitelialnych oraz komórek naczyń krwionośnych i określono go jako dodatni (++) . Nie zauważono istotnych różnic w nasileniu odczynu zarówno w grupach kontrolnych oraz badanych. Wyglądał on także podobnie w preparatach w ślinianki podżuchwowej, w poszczególnych podgrupach wiekowych (ryc. 8, 9).

Odczyn histoenzymatyczny na fosfatazę kwaśną był ujemny we wszystkich grupach badanych i w grupie kontrolnej.

Dyskusja

Międzynarodowa Agenda Badawcza ds. Fluoryzacji na podstawie przeprowadzonych badań stwierdza, że toksyczność związków fluoru często nie jest brana pod uwagę przez lekarzy medycyny i stomatologów. Wskazuje również na konieczność postępowania, które przyczyniłoby się do uzyskania niezaprzeczalnych korzyści wynikających ze stosowania związków fluoru w profilaktyce próchnicy, przy jednoczesnej minimalizacji skutków ubocznych [12, 31, 32, 33].

Niektórzy autorzy sugerują, że wpływ fluoru na różne tkanki odbywa się na poziomie molekularnym. Pierwiastek ten działa hamująco na wiele enzymów, głównie na enzymy aktywowane jonami Mg, związane z tworzeniem energii na drodze tlenowej i beztlenowej [3, 4, 5]. Hamuje on niektóre enzymy cyklu Krebsa, a także pirofosfatazy, enolazę, kinazę pirogronianową i inne enzymy [7, 11]. Na poziomie subkomórkowym fluorki wpływają hamująco na aktywność oksydazy cytochromowej, dehydrogenazy bursztynianowej, oksydazy askorbinianowej [6, 34]. Wynikiem hamowania pirofosfatazy może być upośledzone przyswajanie i katabolizm tłuszczów jako efekt biochemicznych zaburzeń pod wpływem jonów fluoru. Fluorki hamują fosfoglukozomutazę, fosfogliceromutazę, kinazę trójfosfoglicerynianu w wątrobie. Niektórzy autorzy [35, 36, 37] wskazują również, że fluor aktywuje cyklazę adenylową kilka razy silniej niż hormony.

Uwzględniając wątrobę jako narząd, w którym spodziewano się zmian w badaniach histoenzymatycznych spowodowanych przez NaF, wzięto pod uwagę, że bierze ona udział w metabolizmie związków toksycznych powstających w czasie przemian ustrojowych oraz toksyn egzogennych dostających się do organizmu ze środowiska. Fluorek sodu jako terapeutyk lub jako środek toksyczny (zależy to od dawki) może upośledzać czynność wątroby i wywoływać w niej zmiany morfologiczne. W badaniach *Sheaera* [38]

ostra dawka NaF wywołała zmiany w wątrobowych poziomach 9 metabolitów glikolizy i cyklu kwasu cytrynowego. Natomiast w nerkach metabolity te nie uległy istotnym zmianom. Działanie hepatotoksyczne różnych toksyn przejawia się zaburzeniami oddychania komórkowego, prowadząc do zaburzenia mechanizmów utleniania i redukcji, upośledzeniem przemiany białkowej, węglowodanowej, lipidowej oraz transportu wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego. W konsekwencji uszkodzeniu może ulec cała komórka lub poszczególne organelle cytoplazmatyczne. Najczęściej wyraża się to w postaci zwyrodnienia mięszowego, wodniczkowego aż do martwicy komórek wątroby lub zaburzeń w aktywności enzymów metabolicznych [39, 40].

Machoy i *Ogoński* w swoich pracach stwierdzają, że fluor łatwo wnika do mitochondrium zawierającego szereg układów enzymatycznych zaburzając procesy energetyczne [7, 41]. Wpływ na zmniejszenie aktywności energetycznej mitochondrium pod wpływem fluoru potwierdzają również inni badacze [4, 5]. *Cittanowa* i *wsp.* uważają, że mitochondria są głównym obiektem toksycznego działania jonów fluoru w komórkach kanalików zbiorczych nerek [42].

Nieznaczny wzrost odczynu na dehydrogenazę mleczanową uzyskany w doświadczeniu może odzwierciedlać zaburzenia procesów zachodzących w mitochondriach komórek wątroby.

Podwyższony odczyn na fosfatazę kwaśną w wątrobach zwierząt grupy II, szczególnie widoczny w komórkach Browicza–Kupffera, ważnego elementu w diagnostyce naczyń krwionośnych mógł świadczyć o zaburzeniach w metabolizmie wątroby, w której obserwowano również poszerzenie naczyń. Nasilenie reakcji zwiększało się wraz ze wzrostem stężenia NaF i czasem jego podawania. Podobną zależność w badaniach doświadczalnych na szczurach uzyskał *Domińczak* i *wsp.* [43]. Wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej, szczególnie w wątrobach zwierząt 30-dniowych z II grupy sugeruje wzrost aktywności enzymów lizosomalnych. Powyższy obraz korelował z pobudzeniem aparatu Golgiego w hepatocytach tej grupy, w badaniach ultrastrukturalnych.

Ślinianki jako narząd wydzielniczy aktywnie reagują na różne bodźce i ksenobiotyki. Wpływ fluorków na proces wydzielania i aktywność enzymów ślinianki stwierdzili *Hara* i *Yu* [37]. Wykazali oni hamujący wpływ fluorku sodu na aktywność ludzkiej amylazy ślinowej. *Allman* i *Shahed* [36] sugerują, że niskie stężenia NaF może zmieniać funkcję gruczołów ślinowych. NaF w dawce 0,5–2 mg/kg m.c. aktywuje cyklazę adenylową, zwiększa poziom cAMP oraz uwalnianie amylazy z gruczołów przyusznych. Towarzyszy temu spadek aktywności amylazy w śliniance przyusznej. *Tojyo* i *wsp.* [44] obserwowali wzrost wydzielania amylazy przez komórki ślinianki przyusznej szczurów pod wpływem NaF, lecz nie zauważyli znacznego wzrostu poziomu cAMP w tych komórkach po 20 min inkubacji z różnymi stężeniami fluorku sodu. *Mika* i *wsp.* [8] stwierdzili stymulujący wpływ NaF w stężeniu 10 i 30 ppm na aktywność α -amylazy homogenatów ślinianki, trzustki, wątroby i nerki.

Aktywność jonów fluorkowych powoduje spadek aktywności dehydrogenazy bursztynianowej innego enzymu mitochondrialnego, który został potwierdzony w badaniach dotyczących wpływu związków fluoru na wątrobę i inne tkanki [45]. Odczyn na dehydrogenazę bursztynianową ślinianki podżuchwowej w przeprowadzonym doświadczeniu był słabszy w grupie zwierząt otrzymujących większą dawkę fluorku sodu, co mogło mieć związek ze stwierdzanym badaniem ultrastrukturalnym uszkodzeniem mitochondriów [46]. Spadek aktywności dehydrogenazy bursztynianowej u szczurów narażonych na działanie fluorku sodu stwierdzali w nerkach *Takagi i Shiraki* [47], a w wątrobie pod wpływem NH_4F *Czerny* [48] oraz *Humiczewska* [45]. *Chinoy i wsp.* [21] oraz *Humiczewska i wsp.* [45] zaobserwowali spadek aktywności tego enzymu także w mięśniach. W badaniach *Niwelińskiego i Zamorskiej* [9] dehydrogenaza bursztynianowa łożysk ludzkich z okręgów skażonych związkami fluoru nie wykazywała prawie aktywności, a reakcja oksydazy cytochromowej była także osłabiona.

Istnieją sprzeczne doniesienia mówiące o aktywacji lub hamowaniu fosfatazy alkalicznej w różnych tkankach organizmu w wyniku działania jonów fluoru. Spotyka się zarówno opracowania mówiące o hamowaniu tego enzymu, np. w mięśniach, wątrobie, jak również o wzroście aktywności np. w nerkach, surowicy [1, 22, 28]. Odczyn histoenzymatyczny na fosfatazę zasadową w śliniance podżuchwowej był dodatni, nie zauważono istotnych różnic między grupami badanymi i kontrolną. Badania histoenzymatyczne nie wykazały aktywności fosfatazy kwaśnej w śliniance podżuchwowej u szczurów otrzymujących fluorek sodu, jak również w grupach kontrolnych. Wiązało się to prawdopodobnie z faktem niskiej dojrzałości układu lizosomalnego w śliniance młodych zwierząt. Jednak badania innych autorów: *Dominiczak i wsp.* [43], *Takagi i Shiraki* [47], *Sohan i Manocha* [29], wskazują na znaczne zmiany w aktywności tego enzymu w wątrobie i w nerkach zwierząt pod wpływem stosowania związków fluoru. Natomiast w badaniach *Żyłki-Włoszczyk i wsp.* [49] odczyny histoenzymatyczne na fosfatazę kwaśną w nerkach królików narażonych na działanie NaF nie wykazywały zmian.

Sohan i Manocha [29] oceniali cytochemiczną odpowiedź nerek, wątroby i systemu nerwowego na jon fluorkowy podany małpom wiewiórkowatym w dawkach 0, 1 i 5 ppm. W wątrobie przy stosowaniu takich małych dawek nie wykazano istotnych zmian. Natomiast w nerkach ujawniono wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej, enzymów cyklu kwasu cytrynowego i cyklu pentozowego w kanalikach krętych bliższych. Zdaniem autorów, aktywność enzymów lizosomalnych w kłębkach nerkowych tych małych odzwierciedla wzrost metabolizmu wewnątrzkomórkowego i zwiększoną filtrację kłębuszkową nadmiaru fluoru, a wysokie poziomy enzymów lizosomalnych w dystalnych kanalikach wskazują na wzrost katabolizmu komórek w tych miejscach. Badacze ci sugerują, że niektóre efekty cytochemiczne można zinterpretować jako szkodliwe wpływy metaboliczne fluoru na nerki.

Ich zdaniem związki fluoru podane w małych dawkach, lecz przez dłuższy czas nie mogą być całkowicie nieszkodliwe [26, 29].

Wnioski

Wyniki badań własnych oraz innych autorów sugerują ostrożność przy suplementacji endogennej związkami fluoru oraz wskazują na konieczność monitorowania dawki fluoru podczas realizowania programów profilaktyki fluorkowej, szczególnie endogennej. Najnowsze badania nad kariostatycznymi mechanizmami związków fluoru zalecają stosowanie ich miejscowo, egzogennie.

Piśmiennictwo

1. *Bogin E., Abrams M., Avidar Y., Israeli B.*: Effect of fluoride on enzymes from serum, liver, kidney, skeletal and heart muscles of mice. *Fluoride*, 1976, 9, 1, 42–46.
2. *Floriańczyk B., Papierkowski A., Pasternak K.*: Wpływ fluorku sodu na aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej. Ochronny efekt magnezu. *Met. Fluoru*, 1996, 7, 41–44.
3. *Gumińska M.*: Biochemiczne mechanizmy działania fluoru na żywy organizm. *Folia Med. Cracov.* 1981, 23, 3–4, 305–321.
4. *Gumińska M.*: Przewlekłe narażenie człowieka na związki fluoru na terenach uprzemysłowionych i niektóre związane z tym zmiany enzymatyczne oraz konsekwencje zdrowotne. *Met. Fluoru*, 1988, 4, 21–24.
5. *Gumińska M.*: Wpływ fluoru na metabolizm. *Czas. Stomat.* 1983, 36, 9, 645–648.
6. *Machoy Z.*: Biochemiczne mechanizmy działania związków fluoru. *Folia Med. Cracov.* 1987, 28, 1–2, 61–81.
7. *Machoy Z.*: Wpływ związków fluoru na enzymy oddechowe. *Post. Bioch.* 1981, 27, 327–337.
8. *Mika G., Tomasik A., Tarnawski R., Grucka-Mamczar E., Ociepa M.*: Wpływ doświadczalnej fluorozy na aktywność α -amylazy różnych tkanek szczura. *Met. Fluoru*, 1992, 5, 107.
9. *Niweliński J., Zamorska L.*: Morfochemia łożysk ludzkich z okręgu Skawiny. *Folia Med. Cracov.* 1981, 23, 3–4, 347–354.
10. *Pasternak K., Papierkowski A., Floriańczyk B.*: Wpływ fluorku sodu na aminoacylację tRNA in vitro. *Met. Fluoru*, 1996, 7, 38–40.
11. *Shahed A.R., Miller A., Allmann D.W.*: Effect of fluorine containing compounds on the activity of glycolytic enzymes in rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980, 94, 3, 901–908.
12. *Stachowska E.*: Wpływ jonu fluorkowego na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej izolowanej z kory nerki wieprzowej. *Ann. Acad. Med. Stetin.* 1977, 43, 25–40.
13. *Dunipace A., Brizendine E., Wilson M., Zhang W., Wilson C., Katz B. et al.*: Effect of chronic fluoride exposure in uremic rats. *Nephron*, 1998, 78, 96–103.
14. *Dunipace A.J., Brizendine E.J., Zhang W., Wilson M.E., Miller L.L., Katz B.P. et al.*: Effect of aging on animal response to chronic fluoride exposure. *J. Dent. Res.* 1995, 74, 1, 358–368.
15. *Monsour P.A., Kruger B.J.*: Effect of fluoride on soft tissues in vertebrates. *Fluoride*, 1985, 18, 53–61.
16. *Singer L., Ophaug R.H., Armstrong W.D.*: The influence of dietary fluoride restriction on regulation of plasma and soft tissue fluoride contents. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1976, 151, 627–631.
17. *Tomita M., Sugimura T., Koyama M., Kaneko Y.*: The effect of organic and inorganic fluorine compound administration on fluoride levels in the plasma and in the soft and hard tissues of rats breeding on a low-fluoride diet. *Fluoride*, 1993, 26, 3, 212.

18. *Whitford G.M.*: The metabolism and toxicity of fluoride. T. 16. Monographs in Oral Science, 1996.
19. *Whitford G.M., Pashley D.H., Reynolds K.E.*: Fluoride tissue distribution: short-term kinetics. *Am. J. Physiol.* 1979, 236, 2, 141–148.
20. WHO Technical Report Series 846 Fluorides and Oral Health. 1994, 1–19.
21. *Chinoy N.J., Walimbe A.S., Vyas H.A., Mangla P.*: Transient and reversible toxicity in some soft tissues of female mice. *Fluoride*, 1994, 27, 4, 205–214.
22. *Pillai K.S., Mathai A.T., Deskmukh P.B.*: Effect of subacute dosage of fluoride on a male mice. *Toxicol. Lett.* 1988, 44, 21–29.
23. *Waldrott G.L.*: Symposium on the non-skeletal phase of chronic fluorosis. *Fluoride*, 1976, 9, 5–8.
24. *Zaworonkov A.A.*: Nieskieletnyje formy fluoroza. *Arch. Pat.* 1977, 3, 83–91.
25. *Daston G.P., Rehnberg B.F., Carver B., Kavlock R.J.*: Toxicity of sodium fluoride to the postnatally developing rat kidney. *Environ. Res.* 1985, 37, 461–474.
26. *Kessabi M., Braun J.P., Benard P., Burgat-Sacaze V., Rico A.G.*: Acute kidney toxicity of sodium fluoride in the rat. *Toxicol. Lett.* 1980, 5, 169–174.
27. *Kessabi M., Braun J.P., Burgat-Sacaze V., Benard P., Rico A.*: G. Comparison of sodium and stannous fluoride nephrotoxicity. *Toxicol. Lett.* 1981, 7, 463–467.
28. *Machoy-Mokrzyńska A.*: Ocena wybranych parametrów biochemicznych u szczurów przewlekle zatrutowanych związkami fluoru. *Met. Fluoru*, 1992, 5, 99–101.
29. *Manocha S., Sohan L., Warner H., Olkowski Z.L.*: Cytochemical response of kidney, liver and nervous system to fluoride ions in drinking water. *Histochem. J.* 1975, 7, 343–355.
30. *Zawiarta J., Machoy-Mokrzyńska A.*: Wpływ jonów fluorkowych na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej i oksydazy cytochromowej u szczurów ekspozowanych na fluorek amonowy. *Met. Fluoru*, 1992, 5, 102–104.
31. *Burt B.A.*: The changing patterns of systemic fluoride intake. *J. Dent. Res.* 1992, 71, 1228–1237.
32. *Miller G.W.*: Fluoride: a toxic substance. *Fluoride*, 1997, 30, 3, 141.
33. *Weyna E., Buczkowska-Radlińska J., Grocholewicz K.*: Bezpieczeństwo profilaktyki fluorkowej w świetle wiedzy studentów i lekarzy oraz dowodów naukowych. *Czas. Stomatol.* 2005, 58, 397–404.
34. *Machoy Z.*: O mechanizmie powstawania fluorozę zębów. *Czas. Stomatol.* 1987, 40, 3, 186–191.
35. *Allmann D.W., Mapes J.P., Benac M.*: Effect of nontoxic doses of F and SN salts on rat liver metabolism in vivo. *J. Dent. Res.* 1975, 54, 1, 189.
36. *Allmann D.W., Shahed A.R.*: The effect of NaF on salivary gland function. *Dtsch. Zahnärztl. Z.* 42, 1987, 95–98.
37. *Hara K., Yu M.H.*: Effect of fluoride on human salivary amylase activity. *Fluoride*, 1995, 28, 2, 71–74.
38. *Shearer T.R.*: Comparative metabolic responses of rat kidney and liver to acute doses of fluoride. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1974, 209–212.
39. *Grzybek H.*: Badania ultrastrukturalne i histoenzymatyczne wątroby i nerek w doświadczalnym zatruciu octanem ołowiu. *Patol. Pol.* 1982, 1–2, 51–54.
40. *Philips M.J., Poucell S., Patterson J., Valencia P.*: Drug and Toxic Effects. The Liver: Raven Press New York, 1987, 159–171.
41. *Ogoński T., Wieczorek P., Paszkiewicz E., Machoy Z.*: Transport jonów fluorkowych przez wewnętrzną błonę mitochondrialną. *Met. Fluoru*, 1992, 5, 92–93.
42. *Cittanova M.L., Lelongt B., Verpont M.C., Geniteau-Legendre M., Wahbe F., Prie D. et al.*: Fluoride ion toxicity in human kidney collecting duct cells. *Anesthesiology*, 1996, 84, 2, 428–435.
43. *Dominićzak K., Put A., Marcinkiewicz E., Stawarczyk W.*: Doświadczalna ocena wpływu przewleklego stosowania fluorku sodowego na tkankę kostną oraz niektóre narządy wewnętrzne. *Patol. Pol.* 1981, 32, 1, 67–77.
44. *Tojyo Y., Tanimura A., Matsui S., Matsumoto Y., Sugiya H., Furuyama S.*: NaF- induced amylase release from rat parotid cells is mediated by PI breakdown leading to Ca mobilization. *Am. J. Physiol.* 1991, 260, 194–200.
45. *Humiczewska M., Kuzna W., Put A.*: Studies on the toxicology of fluorine compounds. *Folia Biol.* 1989, 37, 3–4, 181–186.
46. *Dąbrowska E., Balunowska M., Sznajka B., Letko R.*: The effect of sodium fluoride on selected internal rat organs – an ultrastructural study. *Acta Toxicol.* 2005, 13, 31–36.
47. *Takagi M., Shiraki S.*: Acute sodium fluoride toxicity in the rat kidney. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.* 1982, 29, 123–130.
48. *Czerny B.*: Wpływ kwercyliny na przebieg przewlekłego zatrucia związkami fluoru u szczurów. *Ann. Acad. Med. Stetin.* 1994, 40, 65–78.
49. *Żyłka-Włoszczyk M., Zajęc-Nędra M., Zajusz K.*: Wpływ podskórnego podania NaF na poziom białka, glukozy i kreatyniny w surowicy krwi oraz zmiany histopatologiczne w wątrobie i nerkach królika. *Med. Pr.* 1982, 33, 5–6, 277–282.

IGOR DZIDZIUL, IZABELA GUTOWSKA, IWONA NOCEN¹, DARIUSZ CHLUBEK

PORÓWNANIE ZAWARTOŚCI FLUORKÓW W POWIERZCHNIOWYCH WARSTWACH SZKLIWA ZĘBÓW MLECZNYCH I STAŁYCH – BADANIA IN VITRO

FLUORIDE CONTENT IN SUPERFICIAL ENAMEL LAYERS OF DECIDUOUS AND PERMANENT TEETH – AN IN VITRO STUDY

Zakład Biochemii, Katedra Biochemii i Chemii Medycznej Pomorskiej Akademii Medycznej
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin

Kierownik: prof. dr hab. n. med. *Dariusz Chlubek*

¹ Zakład Chemii Medycznej, Katedra Biochemii i Chemii Medycznej Pomorskiej Akademii Medycznej
Kierownik: dr hab. n. med. *Joanna Bober*

Summary

Introduction: Enamel exhibits the highest degree of mineralization and is the hardest among tissues. Its non-organic material content is 96–98%, out of which 90% is in the form of hydroxyapatite crystals. Exchange of ions is an important property of hydroxyapatite with the hydroxyl ion (OH⁻) exchanging particularly easily for the fluoride ion (F⁻). F⁻ ions are capable of stabilizing the structure of hydroxyapatite by reducing its solubility and in consequence increasing enamel resistance to caries. The aim of this work was to compare the content of fluoride in superficial layers of enamel obtained from permanent and deciduous teeth.

Material and methods: We collected 55 human permanent and 11 deciduous teeth without any evident damage to or discoloration of the enamel. Microsamples of enamel from the paragingival part on the buccal surface of the tooth were obtained using acid biopsy. Fluoride content was determined using an ion-selective electrode. Calcium content was measured with atomic absorption spectrometry.

Conclusions: We found that enamel of deciduous teeth is more susceptible to acid digestion than in the case of permanent teeth, although the difference was not statistically significant. The content of fluoride decreased with increasing depth of digestion. Deciduous teeth contained significantly less fluoride in every layer studied in comparison with permanent teeth.

K e y w o r d s: permanent teeth – deciduous teeth – enamel – fluoride.

Streszczenie

Wstęp: Szkliwo zębów jest najsilniej zmineralizowaną i najtwardszą tkanką ustroju. W 96–98% składa się ono z materiału nieorganicznego, który w 90% stanowią kryształy hydroksyapatytów. Ważną właściwością hydroksyapatytu jest jego zdolność do wymiany jonowej. Jon hydroksylogowy OH⁻ szczególnie łatwo ulega wymianie na jon fluorkowy F⁻. Jony F⁻ są w stanie stabilizować strukturę hydroksyapatytu, powodując zmniejszenie jego rozpuszczalności i tym samym zwiększenie odporności na próchnicę. Celem pracy było porównanie zawartości fluorków w powierzchniowych warstwach szkliwa zębów stałych i mlecznych.

Materiał i metody: Materiał do badań stanowiło 55 ludzkich zębów stałych i 11 mlecznych bez jakichkolwiek widocznych uszkodzeń i przebarwień szkliwa. Mikropróby szkliwa pobierano metodą biopsji kwasowej z przydziąsłowej części powierzchni policzkowej zębów. Zawartość fluorków oznaczano metodą potencjometryczną, przy użyciu elektrody jonoselektywnej, a zawartość wapnia metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej.

Wnioski: Uzyskane wyniki wskazują, że szkliwo zębów mlecznych jest bardziej podatne na trawienie w porównaniu ze szkliwem zębów stałych, jednak różnice te nie wykazują znamienności statystycznej. Zawartość fluorków maleje wraz z głębokością trawienia, przy czym szkliwo zębów mlecznych zawiera istotnie mniej fluorków w każdej warstwie w porównaniu z zębami stałymi.

H a s ł a: zęby stałe – zęby mleczne – szkliwo – fluorki.

Wstęp

Szklivo zębów jest najsilniej zmineralizowaną i najtwardszą tkanką ustroju, a jego grubość wynosi od 1,0–2,5 mm. W 96–98% składa się ono z materiału nieorganicznego, który w 90% stanowią kryształy hydroksyapatytów, a prawie w 10% nieorganiczna substancja bezpostaciowa (związki wapnia, magnezu i fluoru) [1]. Hydroksyapatyt jest fosforanem wapniowym o stosunku wapnia do fosforu = 1,67 i odpowiadającym mu wzorze chemicznym: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Jest on podstawowym składnikiem dojrzałego i prawidłowo wykształconego szkliwa [2]. W sieci krystalicznej hydroksyapatytu niektóre z miejsc zajmowanych przez atomy wapnia, grupy hydroksylowe lub fosforanowe mogą być podstawiane przez atomy innych pierwiastków, wśród których szczególną rolę odgrywa jon fluorkowy. Posiada on szczególną zdolność do wbudowywania się w sieć krystaliczną hydroksyapatytu, zastępując grupę hydroksylową, i tworzenia fluorohydroksyapatytu [3, 4]. Wiadomo, że jony F^- są w stanie stabilizować strukturę hydroksyapatytu, co powoduje zmniejszenie jego rozpuszczalności [5, 6] i tym samym zwiększenie odporności na próchnicę [7, 8]. Jednak zbyt duża podaż fluorków może być czynnikiem wywołującym zaburzenia mineralizacji szkliwa [9].

Celem pracy było porównanie zawartości fluorków w powierzchniowych warstwach szkliwa zębów stałych i mlecznych.

Material i metody

Materiał badawczy stanowiły ludzkie zęby stałe i mleczne, usuwane z powodów ortodontycznych, protetycznych, w następstwie urazów lub w wyniku chorób przyzębia w kilku przychodniach stomatologicznych Szczecina. W sumie zakwalifikowano do badań 55 zębów stałych i 11 mlecznych, bez widocznych uszkodzeń i przebarwień szkliwa, które przechowywano w temp. 4°C do momentu wykonania oznaczeń. Zęby oczyszczano, osuszano i odtłuszczano acetonem. Mikropróby szkliwa pobierano metodą biopsji kwasowej z przydziąsłowej części policzkowej powierzchni zębów, z miejsca o rozmiarach 2,404 mm², w czasie 30 s, przy użyciu 3 µL kwasu nadchlorowego o stężeniu 0,5 mol/L [10]. Z jednego miejsca pobierano kolejno 3 próby, a uzyskane biopaty umieszczano w oddzielnych, ponumerowanych probówkach typu Eppendorf. We wszystkich biopatach badano następnie zawartość wapnia i fluorków. Przy założeniu stałej, 37,4% (ww.) zawartości wapnia, obliczano masę szkliwa wytrawionego w każdej badanej warstwie.

Zawartość fluorków oznaczano metodą potencjometryczną, z wykorzystaniem elektrody jonoselektywnej firmy Orion, natomiast zawartość wapnia przy użyciu atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w płomieniu acetylenowo-tlenowym (F-AAS), przy długości fali 422,7 nm. Oznaczenia wykonano w środowisku 1% roztworu $\text{La}(\text{NO}_3)_3$,

stosując aparat PU 9100X firmy Philips. Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy użyciu programu Statistica StatSoft. W celu wykazania różnic w zawartości fluorków między zębami stałymi i mlecznymi oraz pomiędzy badanymi warstwami szkliwa przeprowadzono test U Manna–Whitneya, a także analizę korelacji porządku rang Spearmana. Za poziom istotności przyjęto $p \leq 0,05$.

Wyniki

Wyniki przeprowadzonych oznaczeń przedstawiono w tabelach 1 i 2.

Tabela 1. Średnia masa wytrawionego szkliwa trzech powierzchniowych warstw szkliwa badanych zębów stałych i mlecznych

Table 1. Mean mass of enamel biopsied from three superficial enamel layers of permanent and deciduous teeth

Badana warstwa Layer	Masa wytrawionego szkliwa (µg) ± SD Mass of enamel biopsied (µg) ± SD	
	zęby stałe permanent teeth	zęby mleczne deciduous teeth
I	19,41 ± 3,91	21,56 ± 3,31
II	20,89 ± 3,69	22,20 ± 2,18
III	22,03 ± 3,65	22,21 ± 3,18

Zestawione w tabeli 1 wyniki wskazują, że masa wytrawionego szkliwa zwiększała się wraz z głębokością wytrawiania. Ponadto, szkliwo zębów mlecznych było bardziej podatne na trawienie w porównaniu ze szkliwem zębów stałych, jednak różnice te nie wykazywały znamienności statystycznej. Hydroksyapatyt tkanek twardych zawiera węglany i cytryniany. Zawartość węglanów stanowi o stopniu dojrzałości szkliwa. Im jest ich więcej, tym szkliwo jest młodsze. Największą ilość węglanów posiada szkliwo świeżo wyrżniętego zęba. Ilość węglanów wzrasta w głębszych warstwach tkanki i jest znacznie większa w zębach mlecznych. Poza tym, grupy węglanowe są słabiej związane i łatwiej ulegają wymianie na jon fluorkowy [6]. Tłumaczy to uzyskane przez autorów wyniki zawartości fluorków w kolejnych warstwach szkliwa zębów stałych i mlecznych, których średnie przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Średnia zawartość fluorków w trzech powierzchniowych warstwach szkliwa badanych zębów stałych i mlecznych

Table 2. Mean content of fluoride in three superficial enamel layers of permanent and deciduous teeth

Badana warstwa Layer	Zawartość fluorków (mmol/kg szkliwa) ± SD Fluoride content (mmol/kg enamel) ± SD	
	zęby stałe permanent teeth	zęby mleczne deciduous teeth
I	318,26 ± 233,07	180,17 ± 119,92
II	300,24 ± 217,13	157,88 ± 126,99
III	272,45 ± 183,09	155,90 ± 127,55

Zawartość jonów fluorkowych w szkliwie maleje wraz z głębokością wytrawiania, a zależność ta dotyczy zarówno zębów stałych [5, 11, 12,], jak i mlecznych [6]. Obserwacje te potwierdziły się w badaniach własnych. Warstwa pierwsza, zewnętrzna, mająca kontakt ze środowiskiem jamy ustnej, zawierała najwięcej fluorków. W zębach mlecznych ich zawartość wyniosła 180,17 mmol/kg szkliwa, natomiast w zębach stałych 318,26 mmol/kg szkliwa. Różnica wykazała znamienność statystyczną ($p \leq 0,02$). W kolejnych warstwach różnice w zawartości fluorków pomiędzy zębami stałymi i mlecznymi były także istotne, ale na poziomie $p \leq 0,01$.

Dużo większą zawartość jonów fluorkowych w zewnętrznej warstwie szkliwa w porównaniu do warstwy 2. i 3. można tłumaczyć intensywną wymianą grup węglanowych na jony fluorkowe, które zostają trwale włączone w sieć krystaliczną szkliwa w postaci fluorohydroksyapatytu, a także tworzeniem się fluorku wapnia, nietrwale związanego na powierzchni szkliwa. Mniejsza zawartość fluorków w warstwach położonych głębiej odpowiada prawdopodobnie wyłącznie ich ilości związanej z hydroksyapatytem, podstawowym składnikiem budulcowym zęba [3, 10].

Przeprowadzenie analizy korelacji porządku rang Spearmana nie wykazało występowania zależności istotnych statystycznie pomiędzy masą wytrawionego szkliwa a zawartością fluorków w żadnej z badanych warstw, tak w zębach mlecznych, jak i stałych.

Na szczególną uwagę wśród właściwości hydroksyapatytu zasługuje jego heksagonalna struktura krystaliczna. Ułożenie przestrzenne atomów w kryształach warunkuje jego właściwości fizyczne i chemiczne. Ważną właściwością hydroksyapatytu jest jego zdolność do wymiany jonowej. Jon hydroksylowy OH^- szczególnie łatwo ulega wymianie na jon fluorkowy F^- . Jony fluorkowe wprowadzone do sieci krystalicznej zajmują pozycje grup OH^- . Powoduje to kurczenie się siatki apatytu, a minerał ulega zagęszczeniu przestrzennemu. W ślad za tym wzmacnia się jego trwałość chemiczna [13]. Hydroksyapatyt umożliwia depozycję związków mineralnych z powierzchniowych warstw szkliwa do głębiej położonych. Zachodzi to prawdopodobnie na drodze dyfuzji [13]. Fluorki wbudowane w siatkę hydroksyapatytu powodują powstanie fluoroapatytu lub fluorohydroksyapatytu, czyli form bardziej odpornych na rozpuszczanie [6, 14]. Według *Jakubowskiej i wsp.*, jon fluorkowy dzięki swoim rozmiarom i właściwościom pasuje lepiej do przestrzennej struktury apatytu niż jon hydroksylowy [5]. Powoduje to zagęszczenie minerału, przez co zwiększa się jego twardość. Jon fluorkowy jest bardzo reaktywny. Prawie zawsze występuje w formie związków, rzadko w formie zjonizowanej. Podczas remineralizacji szybko wbudowuje się w struktury rosnących kryształów i wypiera jony hydroksylowe. Na powierzchni szkliwa tworzy ochronną warstwę fluorku wapnia, ułatwiającą szybką i sprawną jego odbudowę [15]. Pomimo intensywnych badań zmierzających do ustalenia optymalnych warunków stosowania fluorków w profilaktyce próchnicy zębów, nie wypracowano dotąd

modelu jednolitego i zawsze skutecznego. Stąd istnieje ciągle konieczność prowadzenia prac eksperymentalnych skupiających się na badaniu procesów fizykochemicznych zachodzących w warstwie powierzchniowej szkliwa oraz na granicy szkliwa i środowiska jamy ustnej.

Wnioski

1. Szkliwo zębów mlecznych jest bardziej podatne na trawienie w porównaniu ze szkliwem zębów stałych.
2. Zawartość fluorków maleje wraz z głębokością wytrawiania, przy czym szkliwo zębów mlecznych zawiera znamienne mniej fluorków w każdej warstwie w porównaniu ze szkliwem zębów stałych.
3. Jon fluorkowy odgrywa znaczącą rolę w ochronie szkliwa zębów przed niszczącym wpływem niskiego pH.

Piśmiennictwo

1. *Torrado A., Valiente M., Zhang W. et. al.*: Remineralization potential of a new toothpaste formulation: an in vitro study. *J. Contemp. Dent. Pract.* 2004, 5, 18–30.
2. *Jakubowska K.*: Zastosowanie kwasowej biopsji szkliwnej w badaniach zębów ludzkich przy uwzględnieniu wieku osobniczego i warunków środowiska. *Ann. Acad. Med. Stetin.* 2002, 48, 213–230.
3. *Łagocka R., Opalko K., Ogoński T.*: Zawartość fluorków i magnezu w powierzchniowych warstwach szkliwa ludzkich zębów stałych (badania in vitro). *Met. Fluoru*, 1998, 8, 52–57.
4. *Machoy Z.*: Fluor w środowisku – mechanizmy korzystnego i szkodliwego oddziaływania. XXXI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Materiały zjazdu, Kraków 1996, 33.
5. *Jakubowska K., Chlubek D., Łagocka R., Rać M., Opalko K., Stokowska W.*: Fluoride concentration in superficial enamel layers of permanent teeth in children residing in areas with different levels of environmental pollution with fluorine compounds. *Environ. Sci. Technol.* 2004, 11, 337–344.
6. *Szczepańska J.*: Analiza pierwiastków wchodzących w skład szkliwa zębów mlecznych w badaniach in vitro po zastosowaniu preparatów remineralizujących zawierających NaF i ksylitol. *Czas. Stomatol.* 1999, 52, 12.
7. *Chłapowska J., Borysewicz-Lewicka M.*: Profilaktyka fluorkowa próchnicy zębów w środowisku wielkomiejskim na przestrzeni ostatnich lat. *Met. Fluoru*, 2002, 10, 80–85.
8. *Grocholewicz K., Tomasik M., Chlubek D., Samujło D.*: Zmiany zawartości fluorków w ślinie po zastosowaniu fluorkowej pasty do zębów. *Met. Fluoru*, 2002, 10, 96–101.
9. *Chłapowska J.*: Zaburzenia rozwojowe szkliwa zębów stałych u dzieci i młodzieży województwa poznańskiego. *Met. Fluoru*, 1998, 8, 46–51.
10. *Bruun C., Munksgaard E.C., Stoltz K.*: A field biopsy method for fluoride determinations in human surface enamel. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 1975, 3, 217–222.
11. *Ey-Chmielewska H., Łagocka R., Opalko K., Frączak K.*: Zawartość wybranych biopierwiastków w powierzchniowych warstwach szkliwa ludzkich zębów stałych bez uszkodzeń i z patologicznym starciem (badania in vitro). *Met. Fluoru*, 1999, 9, 72–77.
12. *Opalko K., Łagocka R., Marczuk-Kolada G., Stokowska W.*: Zawartość fluorków w powierzchniowych warstwach szkliwa zębów stałych u dzieci szczecińskich i białostockich (badania in vitro). *Met. Fluoru*, 1999, 9, 67–71.

13. *Ten Cate J.M., Featherstone J.D.B.*: Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1991, 2, 283–296.
14. *Jańczuk Z., Szymaniak E.*: Próchnica zębów. PZWL, Warszawa 1994.
15. *Colin D.*: What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid. *J. Can. Dent. Assoc.* 2003, 69, 722–724.

MAGDALENA GAŚSOWSKA, BARBARA DOŁĘGOWSKA, DARIUSZ CHLUBEK

WPLYW JONÓW FLUORKOWYCH NA AKTYWNOŚĆ WYMIENIACZA SODOWO-PROTONOWEGO PŁYTEK KRWI – DONIESIENIE WSTĘPNE

THE EFFECT OF FLUORIDE IONS ON THE ACTIVITY OF THE PLATELET SODIUM-PROTON EXCHANGER: A PRELIMINARY REPORT

Zakład Biochemii, Katedra Biochemii i Chemii Medycznej Pomorskiej Akademii Medycznej
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin
Kierownik: prof. dr hab. n. med. *Dariusz Chlubek*

Summary

Introduction: The sodium-proton exchanger (NHE) is a transmembrane protein present in cell membranes of all species studied so far. It operates as an antiporter removing protons from the cell in exchange for sodium ions. Various factors are known to affect the activity of NHE.

The aim of this work was to study the effect of fluoride on the activity of NHE in human platelets.

Material and methods: Platelets obtained from healthy volunteers were incubated for 5, 10, 15, or 20 minutes in sodium fluoride (NaF) at a concentration of 2.5, 5.0, 7.5, or 10 mmol/L. NHE activity in platelets exposed to NaF was measured with a spectrophotometric method and was compared with activity in control platelets unexposed to NaF.

Conclusions: Mean NHE activity in control platelets was 5.22 ± 1.84 /PLTC/min. NaF at 2.5 mmol/L reduced NHE activity producing a minimum after 10 min of incubation whereupon activity increased reaching 5.44 ± 3.97 /PLTC/min after 20 min of incubation. NaF was inhibitory at higher concentrations and the following NHE activities were noted: 4.37 ± 1.66 /PLTC/min ($p = 0.006235$) at 5.0 mmol/L, 4.05 ± 1.15 /PLTC/min ($p = 0.000253$) for 7.5 mmol/L and 4.25 ± 1.40 /PLTC/min ($p = 0.008891$) for 10 mmol/L.

K e y w o r d s: Sodium-proton exchanger – platelets – sodium fluoride.

Streszczenie

Wstęp: Wymieniacz sodowo-protonowy (NHE) jest białkiem transbłonowym, obecnym w błonach komórkowych wszystkich poznanych organizmów żywych. Działa na zasadzie antyportu, eliminując z wnętrza komórki proton z jednoczesnym wprowadzeniem na jego miejsce jonu sodowego. Jego aktywność może być modyfikowana przez różnorodne czynniki.

Celem niniejszej pracy była analiza wpływu jonu fluorkowego na działanie NHE w ludzkich płytkach krwi.

Material i metody: Materiał badawczy stanowiły trombocyty pozyskane z krwi zdrowych wolontariuszy, które inkubowano w roztworach fluorku sodu (NaF) o stężeniu 2,5; 5,0; 7,5 i 10 mmol/L przez 5, 10, 15 i 20 minut. Aktywność NHE w płytkach inkubowanych z NaF oznaczano metodą spektrofotometryczną i porównywano z aktywnością odnotowaną w płytkach niepoddanych działaniu fluorku sodowego.

Wnioski: Średnia aktywność NHE w niestymulowanych płytkach krwi wynosiła $5,22 \pm 1,84$ /liczba płytek (PLTC)/min. Fluorek sodu o stężeniu 2,5 mmol/L powodował zmniejszenie aktywności NHE, która osiągnęła minimum po 10 min inkubacji. W miarę wydłużania czasu inkubacji aktywność wymieniacza powracała do wartości sprzed stymulacji, osiągając po 20 min $5,44 \pm 3,97$ /PLTC/min. Traktowanie płytek roztworami NaF o stężeniach wyższych od 2,5 mmol/L powodowało spadek aktywności białka do wartości $4,37 \pm 1,66$ /PLTC/min ($p = 0,006235$) dla stężenia 5,0 mmol/L, $4,05 \pm 1,15$ /PLTC/min ($p = 0,000253$) dla stę-

zenia 7,5 mmol/L i $4,25 \pm 1,40$ /PLTC/min ($p = 0,008891$) dla stężenia 10 mmol/L.

H a s ł a: wymienniczą sodowo-protonową – płytki krwi – fluorek sodu.

Wstęp

Wymienniczą sodowo-protonową (NHE) jest białkiem transbłonowym, obecnym w błonach komórkowych wszystkich poznanych organizmów żywych. Działa na zasadzie antyportu, eliminując z wnętrza komórki proton z jednoczesnym wprowadzeniem na jego miejsce jonu sodowego [1, 2, 3, 4]. Powszechność występowania tego białka oraz różnorodność czynników wpływających na jego aktywność (hormony, czynniki wzrostu, zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wodorowych i wapniowych, zmiany objętości komórki) sugerują, iż odgrywa ono bardzo istotną rolę w regulacji kluczowych procesów wewnątrzkomórkowych [2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14]. Wymienniczą sodowo-protonową uczestniczy w regulacji wewnątrzkomórkowego pH [2, 15], co w zasadniczy sposób wpływa na regulację procesów inicjacji proliferacji i wzrostu wielu komórek oraz transdukcję sygnału od receptora do wnętrza komórki [16, 17]. Wymienniczą bierze także udział w regulacji objętości komórek oraz w transporcie jonów i niektórych metabolitów przez błony komórek nabłonkowych. W kanalikach proksymalnych nerek białko NHE jest niezbędne w procesie resorpcji zwrotnej jonów HCO_3^- , natomiast w jelicie cienkim odgrywa istotną rolę w procesie wchłaniania aminokwasów, dwupeptydów i niektórych leków [2, 4, 17, 18].

W świetle dostępnej literatury brak jest dostatecznych danych opisujących w wyczerpujący sposób wpływ jonu fluorkowego na aktywność płytkowej NHE. Jon fluorkowy może działać hamująco lub aktywująco na różne funkcje elementów morfotycznych krwi. Na przykład w cieniach erytrocytów ludzi narażonych na działanie związków fluoru, zaobserwowano zaburzenia pracy pomp kationowych. Jest to spowodowane bezpośrednim hamowaniem przez fluorki ATP-azy sodowo-potasowej. In vivo jon fluorkowy powoduje obniżenie poziomu ATP w erytrocytach. Z kolei działając na granulocyty, monocyty i płytki krwi powoduje wzrost ilości produktów metabolizmu kwasu arachidonowego, które mogą aktywować NHE [17].

Celem niniejszej pracy była analiza wpływu jonu fluorkowego na działanie płytkowej wymienniczą sodowo-protonowej.

Material i metody

Material badawczy stanowiły trombocyty pozyskane z krwi zdrowych wolontariuszy pochodzącej z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Szczecinie. Zawieszano je w buforze Tyroda o pH = 7,4 w celu uzyskania

zawiesiny płytkowej o odpowiedniej gęstości (liczba płytek, PLTC: $1-2 \times 10^8$ /mL). Płytki inkubowano przez 5, 10, 15 i 20 min w roztworach fluorku sodowego (NaF) o stężeniach: 2,5; 5,0; 7,5 i 10 mmol/L w łaźni wodnej w temp. 37°C.

Aktywność płytkowej NHE oznaczano pośrednio metodą spektrofotometryczną, poprzez pomiar zmian objętości komórek zawieszonych w roztworze zawierającym wysokie stężenie propionianu sodu. Wolny anion propionianowy pozostaje w równowadze z niezdisocjonowanym kwasem propionowym, który jest lipofilny i łatwo penetruje błonę plazmatyczną płytek krwi. W cytozolu kwas propionowy dysocjuje, wywołując obniżenie pH, co z kolei powoduje aktywację NHE. Wymiana cytozolowych jonów H^+ na zewnątrzkomórkowe jony Na^+ powoduje nagromadzenie się propionianu sodu w komórce, czego konsekwencją jest napływ wody do komórki, jej pęcznienie z towarzyszącą zmianą gęstości optycznej zawiesiny płytkowej, którą mierzono przy długości fali λ -800 nm.

Aktywność NHE w płytkach inkubowanych z NaF porównano z aktywnością wymienniczą oznaczoną w płytkach niepoddanych działaniu fluorku sodowego.

Wyniki opracowano statystycznie przy użyciu programu Statistica PL v 6.1 (StatSoft, Kraków). Zastosowano test t-Studenta dla zmiennych zależnych. Istotność statystyczną przyjęto na poziomie mniejszym od 0,05 ($p < 0,05$).

Wyniki

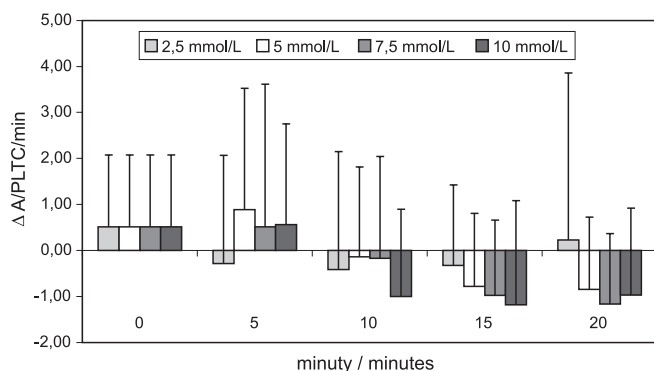
Średnie wartości aktywności NHE w płytkach poddanych działaniu różnych stężeń NaF, działającego na płytki w różnym czasie inkubacji, przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Średnie wartości aktywności wymienniczą sodowo-protonowej w płytkach krwi poddanych działaniu fluorku sodu
Table 1. Mean activity of the platelet sodium-proton exchanger exposed to NaF

Czas (min) Time (min)	Stężenie NaF (mmol/L) NaF concentration			
	2,5	5,0	7,5	10,0
	Wartość średnia \pm odchylenie standardowe Mean \pm standard deviation (A_{800} /PLTC/min)			
5	4,93 \pm 2,17	6,11 \pm 3,45	5,73 \pm 2,55	5,78 \pm 2,08
10	4,81 \pm 2,10	5,08 \pm 2,41	5,05 \pm 1,65	4,22 \pm 1,30
15	4,89 \pm 1,55	4,44 \pm 1,67	4,24 \pm 1,41	4,03 \pm 1,40
20	5,44 \pm 3,97	4,37 \pm 1,66	4,05 \pm 1,15	4,25 \pm 1,40

Średnia aktywność NHE w niestymulowanych płytkach krwi wynosiła $5,22 \pm 1,84$ /liczba płytek (PLTC)/min. Fluorek sodu o stężeniu 2,5 mmol/L, dodany do zawiesiny płytkowej spowodował zmniejszenie aktywności NHE, która osiągnęła minimum po 10 min inkubacji. Dalsze wydłużenie czasu inkubacji spowodowało stopniowy wzrost aktywności NHE, osiągając w 20 min traktowania zawiesiny płytkowej fluorkiem sodu wartość $5,44 \pm 3,97$ /PLTC/min. Inkubacja

zawiesiny płytkowej z fluorkiem sodu o stężeniu 5 mmol/L w pierwszych 5 min inkubacji spowodowała wzrost aktywności wymiennicza, osiągając wartość $6,11 \pm 3,45$ /PLTC/min, po której w miarę upływu czasu inkubacji następował stopniowy spadek aktywności NHE, osiągając w 10 min inkubacji $5,08 \pm 2,41$ /PLTC/min, w 15 min $4,44 \pm 1,67$ /PLTC/min ($p = 0,011504$), aż do wartości równej $4,37 \pm 1,66$ /PLTC/min, którą obserwowano po upływie 20 min ($p = 0,006235$). Traktowanie zawiesiny płytkowej fluorkiem sodu o stężeniu 7,5 mmol/L powodowało wzrost aktywności NHE, który następował po 5 min inkubacji, osiągając wartość maksymalną równą $5,73 \pm 2,55$ /PLTC/min, po czym obserwowany był spadek aktywności białka w miarę upływu czasu, osiągając $5,05 \pm 1,65$ /PLTC/min po 10 min; $4,24 \pm 1,41$ /PLTC/min po 15 min ($p = 0,002794$) i wartość minimalną $4,05 \pm 1,15$ /PLTC/min po 20 min inkubacji ($p = 0,000253$). Analogiczne zmiany aktywności NHE do obserwowanych pod wpływem fluorku sodu o stężeniach 5 i 7,5 mmol/L notowano, traktując zawiesinę płytkową fluorkiem sodu o stężeniu 10 mmol/L. W pierwszych 5 min inkubacji zauważalny był ewidentny wzrost aktywności wymiennicza osiągający wartość maksymalną równą $5,78 \pm 2,08$ /PLTC/min, po czym następował spadek do wartości $4,25 \pm 1,40$ /PLTC/min po 20 min inkubacji ($p = 0,008891$). Dodatkowo, celem zobrazowania zachowania płytkowego wymiennicza NHE pod wpływem różnych stężeń NaF w różnych czasach inkubacji, uzyskane wyniki przedstawiono w formie graficznej. Na rycinie 1 przedstawiono wpływ NaF w stężeniach 2,5; 5; 7,5 i 10 mmol/L na zmiany aktywności NHE w ludzkich płytkach krwi, po upływie czasu inkubacji, odpowiednio: 0, 5, 10, 15 i 20 minut.



Ryc. 1. Wpływ fluorku sodu na zmiany aktywności płytkowego wymiennicza sodowo-protonowego

Fig. 1. The effect of NaF on the activity of the platelet sodium-proton exchanger

Z ryciny ewidentnie wynika, iż o ile NaF w stężeniu 2,5 mmol/L (mimo obserwowanego po upływie 5, 10 i 15 min inkubacji obniżenia aktywności NHE) wywoływał po 20 min zwiększenie aktywności NHE do wartości $5,44 \pm 3,97$ /PLTC/min, to wzrost stężenia NaF do 5; 7,5 i 10 mmol/L prowadził do spadku aktywności NHE obserwowanego już od 10 min inkubacji i pogłębiającego się w miarę wydłużania jej czasu, osiągając wartości minimalne po 20 minutach. Dokonując analizy statystycznej, polegającej na porównaniu

aktywności NHE inkubowanego z NaF z próbą kontrolną, zaobserwowano istotne statystycznie następujące różnice: przy stężeniu NaF 5; 7,5 i 10 mmol/L w czasie 15 i 20 min (kontrola – 5 mmol/L F, $t = 15$) $p = 0,011504$; (kontrola – 5 mmol/L F, $t = 20$) $p = 0,006235$; (kontrola – 7,5 mmol/L F, $t = 15$) $p = 0,002794$; (kontrola – 7,5 mmol/L F, $t = 20$) $p = 0,000253$; (kontrola – 10 mmol/L F, $t = 15$) $p = 0,007776$; (kontrola – 10 mmol/L F, $t = 20$) $p = 0,008891$. Wskazuje to na istotny wpływ wydłużania czasu inkubacji zawiesiny płytkowej z jonami F^- na aktywność białka NHE.

Dyskusja

Na podstawie badań własnych wykazano, że zwiększanie stężenia NaF i wydłużanie czasu inkubacji powodują spadek aktywności NHE w niestymulowanych płytkach krwi.

Mechanizm działania NaF na aktywność NHE w płytkach krwi nie został jeszcze dokładnie poznany. *Ozaki i wsp.*, *Murer i wsp.*, *Lazarowski i Lapetina*, *Kienast i wsp.*, *Poll i wsp.* oraz *Pfliegler i wsp.* opisali efekty działania fluorku sodu i fluorku glinu na płytki krwi stymulowane różnymi agonistami [19, 20, 21, 22, 23, 24].

Istnieją przypuszczenia, że NaF może naśladować agonistów indukujących reakcje płytkowe poprzez oddziaływanie z białkami G (biorącymi udział w przepływie informacji od receptorów zlokalizowanych na powierzchni błony do różnych efektorów, takich jak: fosfolipaza C, fosfolipaza A_2 , cykliczna adenylanowa) lub z kanałami wapniowymi [19, 21, 22, 25]. *Ozaki i wsp.* sugerują możliwość interakcji jonu fluorkowego ze specyficznym białkiem G_p , połączonym z receptorem aktywującym fosfolipazę C [19, 23].

Pfliegler i wsp. uważają, że NaF w niestymulowanych płytkach krwi aktywuje fosfolipazę C w sposób niezależny od sekrecji ADP, endogennego PAF czy eikozanoidów [24]. Zakładając słuszność hipotezy o stymulującym wpływie fluorków na fosfolipazę C, a także biorąc pod uwagę model aktywacji płytek krwi, można wysunąć wniosek, że jony fluorkowe, aktywując fosfolipazę C i powodując dalej hydrolizę PIP_2 do IP_3 i DAG, mobilizację wapnia, syntezę TxA_2 oraz aktywację kinazy C, powinny stymulować wrażliwość na działanie amiloridu antyport Na^+/H^+ [26, 27].

Dane te są jednak w sprzeczności z wynikami badań *Sifferta*, które wskazują, że o ile z jednej strony NaF powodował mobilizację wapnia z wewnątrzkomórkowych magazynów, to z drugiej skutecznie hamował wzrost wewnątrzkomórkowego pH (pHi). Świadczy to raczej o hamującym działaniu jonu fluorkowego na NHE [28].

Siffert i wsp. stwierdzili, że NaF o stężeniu 2,5 mmol/L, dodany do płytek stymulowanych trombiną powoduje zmniejszenie aktywności NHE, która podczas dłuższej inkubacji powraca do wartości sprzed stymulacji [29]. W badaniach własnych potwierdzono te obserwacje w odniesieniu do płytek niestymulowanych żadnym agonistą. Można zatem stwierdzić, że mechanizm działania fluorku sodu na płytki krwi jest niezależny od ich aktywacji agonistami. Z drugiej strony

jednak, preinkubacja płytek z 2,5 mmol/L NaF zapobiega późniejszej aktywacji wymiennicza przez trombinę [29].

Dłuższa inkubacja niestymulowanych płytek krwi z NaF o stężeniach większych od 2,5 mmol/L wywołuje silny efekt hamujący aktywność NHE, który nie ulega zmianie w miarę wydłużania się czasu inkubacji. Pewną próbą wytłumaczenia mechanizmu hamującego działania jonu fluorkowego na antyport sodowo-protonowy była hipoteza, zakładająca związek pomiędzy inhibicją białka NHE i zmniejszeniem ilości ATP, spowodowanym przez NaF. Jednak wyniki badań, w których zastosowano wysokie stężenia NaF, wywołujące spadek ATP, analogiczny do powodowanego przez trombinę, nie potwierdziły tych przypuszczeń [29, 30]. *Siffert i wsp.* postulują mechanizm hamowania NHE za pośrednictwem białka G, które aktywowane przez fluorki działa jak ujemny regulator wymiennicza [29].

Wniosek

Roztwór fluorku sodu o stężeniu 2,5 mmol/L powoduje krótkotrwałe i odwracalne hamowanie aktywności płytkowego wymiennicza sodowo-protonowego. Fluorek sodu o stężeniach większych od 5 mmol/L powoduje nieodwracalne zahamowanie aktywności płytkowego NHE, które nasila się wraz z wydłużeniem czasu inkubacji.

Piśmiennictwo

1. *Siffert W., Akkerman J.W.N.*: Na⁺/H⁺ exchange and Ca²⁺ influx. Discussion letter. *FEBS Lett.*, 1989, 259, 1–4.
2. *Kicińska A.*: Mammalian Na⁺/H⁺ exchangers. *Post. Bioch.* 2000, 46, 177–184.
3. *Bober J.*: Erythrocyte sodium-proton exchanger activity and oxidative stress in patients with chronic renal failure treated conservatively or with hemodialysis. *Ann. Acad. Med. Stetin.* 2003, Suppl. 90.
4. *Tomasiak M.*: Rola wymiennicza Na⁺/H⁺ w procesie aktywacji płytek krwi świni. [Maszynopis powielany] *Akad. Med. w Białymstoku, Białystok* 1994.
5. *Goss G.G. et al.*: ATP dependence of NHE1, the ubiquitous isoform of the Na⁺/H⁺ antiporter. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 8741.
6. *Aharonovitz O., Zaun H.C., Balla T., York J.D., Orlowski J., Grinstein S.*: Intracellular pH regulation by Na⁺/H⁺ exchange requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Cell Biol.* 2000, 150, 213–224.
7. *Livne A.A., Aharonovitz O., Fridman H., Tsukitani Y., Markus S.*: Modulation of Na⁺/H⁺ exchange and intracellular pH by protein kinase C and protein phosphatase in blood platelets. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, 1068, 161–166.
8. *Barber D.L.*: Mechanisms of receptor-mediated regulation of Na-H exchange. *Cell. Signal.* 1991, 3, 387–397.
9. *Livne A.A., Sardet C.*: The Na⁺/H⁺ exchanger is phosphorylated in human platelets in response to activating agents. *FEBS Lett.* 1991, 284, 219–222.
10. *Kimura M., Cho J.H., Reeves J.P., Aviv A.*: Inhibition of Ca²⁺ entry by Ca²⁺ overloading of intracellular Ca²⁺ stores in human platelets. *J. Physiol.* 1994, 479, 1–9.
11. *Moor A.N., Fliegel L.*: Protein kinase-mediated regulation of the Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger in the rat myocardium by mitogen-activated protein kinase-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 22985–22992.
12. *Numata M., Petreeca K., Lake N., Orlowski J.*: Identification of a mitochondrial Na⁺/H⁺ exchanger. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 6951.
13. *Roskopf D.*: Sodium-hydrogen exchange and platelet function. *J. Thromb. Thrombolysis*, 1999, 8, 15–19.
14. *Wakabayashi S., Ikeda T., Noel J., Shmitt B., Orlowski J., Pouyssegur J. et al.*: Cytoplasmic domain of the ubiquitous Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 can confer Ca²⁺ responsiveness to the apical isoform NHE3. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 26460–26465.
15. *Chow C.W., Woodside M., Demaux N., Yu F.H., Plant P., Rotin D. et al.*: Proline-rich motifs of the Na⁺/H⁺ exchanger 2 isoform. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 10481–10488.
16. *Orlowski J., Kandasamy R.A.*: Delineation of transmembrane domains of the Na⁺/H⁺ exchanger that confer sensitivity to pharmacological antagonists. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 19922–19927.
17. *Bober J., Chlubek D., Kwiatkowska E., Kędzińska K., Stachowska E., Wieczorek P. et al.*: Influence of fluoride ions on Na⁺/H⁺ exchanger activity in human red blood cells. *Fluoride*, 2001, 34, 174–180.
18. *Yu F.H., Shull G.E., Orlowski J.*: Functional properties of the rat Na⁺/H⁺ exchanger NHE-2 isoform expressed in Na⁺/H⁺ exchanger-deficient Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 25536–25541.
19. *Ozaki Y., Satoh K., Yatomi Y., Kume S.*: Low concentration of sodium fluoride inhibits Ca²⁺ influx induced by receptor-mediated platelet activation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, 1147, 27–34.
20. *Murer E.H., Davenport K., Siojio E., Day H.J.*: Metabolic aspects of the secretion of stored compounds from blood platelets. *Biochem. J.* 1981, 194, 187–192.
21. *Lazarowski E.R., Lapetina E.G.*: Activation of platelet phospholipase C by fluoride is inhibited by elevation of cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989, 158, 440–444.
22. *Kienast J., Arnout J., Deckmyn H., Pfliegler G., Vermeylen J.*: On the role of guanine nucleotide binding regulatory proteins (G-proteins) in signal transduction in human platelets: studies with sodium fluoride. *AAS 20:3rd Cologne Atherosclerosis Conference*, 1986.
23. *Poll Ch., Kyrle P., Westwick J.*: Activation of protein kinase C inhibits sodium fluoride-induced elevation of human platelet cytosolic free calcium and thromboxane B₂ generation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986, 136, 381–389.
24. *Pfliegler G., Arnout J., Kienast J., Hoet W.B., Deckmyn H., Vermeylen J.*: Sodium fluoride induced activation of phospholipase C in intact human platelets does not depend on ADP, PAF or arachidonate products. *Thromb. Res.* 1993, 69, 541–545.
25. *Kondo K., Kitada Ch., Yoshioka A., Sakane H., Kokawa T., Yasunaga K.*: Inhibition of platelet aggregation by low concentration of sodium fluoride. *Int. J. Hematol.* 1991, 54, 411–417.
26. *Brom C., Koller M., Brom J.*: Effect of sodium fluoride on the generation of lipoxigenase products from human polymorphonuclear granulocytes, mononuclear cells and platelets – indication for the involvement of G proteins. *Immunology*, 1989, 68, 240–246.
27. *Dmoszyńska A., Robak T.*: *Podstawy hematologii*. Wyd. Czelej, Lublin 2003.
28. *Siffert W.*: Regulation of platelet function by sodium-hydrogen exchange. Review article. *Cardiovasc. Res.* 1995, 29, 160–166.
29. *Siffert W., Jakobs K.H., Akkerman J.W.*: Sodium fluoride prevents receptor and protein kinase C – mediated activation of the human platelet Na/H exchanger without inhibiting its basic pH_i – regulating activity. *J. Biol. Chem.* 1990, 265, 15441–15448.
30. *Nakamura S., Kobayashi T., Yagi S., Yamamura H.*: Protein phosphorylation and activation of human platelets by sodium fluoride. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988, 151, 242–247.

KATARZYNA GROCHOLEWICZ, IWONA NOCEN¹, IZABELA GUTOWSKA²

WPLYW NAWYKÓW HIGIENICZNO-ZDROWOTNYCH NA ZAWARTOŚĆ WYBRANYCH JONÓW W ŚLINIE KOBIET PO MENOPAUZIE

THE INFLUENCE OF HYGIENE AND HEALTH HABITS ON THE CONCENTRATION OF SOME IONS IN SALIVA OF POSTMENOPAUSAL WOMEN

Zakład Stomatologii Ogólnej Pomorskiej Akademii Medycznej
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin

Kierownik: prof. dr hab. n. med. *Elżbieta Weyna*

¹ Zakład Chemii Medycznej, Katedra Biochemii i Chemii Medycznej Pomorskiej Akademii Medycznej

al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin

Kierownik: dr hab. n. med. *Joanna Bober*

² Zakład Biochemii, Katedra Biochemii i Chemii Medycznej Pomorskiej Akademii Medycznej

al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin

Kierownik: prof. dr hab. n. med. *Dariusz Chlubek*

Summary

Purpose: The study was designed to evaluate the influence of tooth-brushing, milk consumption, hormone therapy, allergy, and cigarette smoking on the content of fluoride, calcium, magnesium and phosphorus in saliva.

Material and methods: Unstimulated saliva samples were collected from 100 women aged 48–70 years. Biochemical analysis was done to measure ion content. A questionnaire was used to determine hygiene and health habits. Correlation analysis was done to determine the relationships between parameters.

Conclusions: A significant correlation was observed between ion content in saliva and frequency of tooth-brushing, smoking, and use of oral contraceptives. More frequent tooth-brushing was associated with reduced salivary content of calcium and phosphorus. Significantly higher salivary calcium levels were observed in smokers than non-smokers. Oral contraceptives produced significantly higher concentrations of fluoride ions in saliva. No correlation was noted between ion content in saliva and milk consumption, hormone replacement therapy (HRT), or allergy.

K e y w o r d s: saliva – fluoride, calcium, magnesium and phosphorus ions – oral hygiene – milk consumption – hormone preparations – cigarette smoking.

Streszczenie

Wstęp: Celem pracy było zbadanie wpływu częstości oczyszczania zębów, konsumpcji mleka, stosowania preparatów hormonalnych, występowania alergii i palenia papierosów na zawartość jonów fluoru, wapnia, magnezu i fosforu w ślinie.

Material i metody: Niestymulowaną ślinę mieszaną 100 kobiet w wieku 48–70 lat poddano analizie biochemicznej i określono w niej stężenie powyższych jonów. Na podstawie badania ankietowego pacjentek uzyskano informacje na temat ich nawyków higieniczno-zdrowotnych. W celu określenia zależności pomiędzy badanymi parametrami wykonano analizę korelacji.

Wnioski: Stwierdzono, że na stężenie badanych jonów w ślinie miała wpływ częstość szczotkowania zębów, palenie papierosów i stosowanie hormonalnych środków antykoncepcyjnych. Częstsze szczotkowanie zębów powodowało spadek zawartości wapnia i fosforanów w ślinie. U pacjentek palących papierosy stwierdzono w ślinie statystycznie wyższe stężenie jonów wapnia niż u niepalących. W ślinie pacjentek stosujących wcześniej antykoncepcyjne środki hormonalne stwierdzono istotnie wyższy poziom fluorków w porównaniu do kobiet nieużywających tego rodzaju preparatów. Nie zaobserwowano związku pomiędzy konsumpcją mleka, stosowaniem hormonalnej terapii zastępczej i występowaniem alergii a stężeniem badanych jonów w ślinie.

H a s ł a: ślina – jony fluoru, wapnia, magnezu i fosforu – higiena jamy ustnej – konsumpcja mleka – preparaty hormonalne – palenie papierosów.

Wstęp

Ślina jest wydzieliną wytwarzaną przez trzy pary dużych gruczołów ślinowych: przyuszne, podjęzykowe i podżuchwowe oraz liczne mniejsze gruczoły rozsiane w błonie śluzowej warg, podniebienia miękkiego, języka i policzków. Wydzielanie śliny odbywa się ustawnie i dobowo wynosi 1–2 litrów, a jej objętość i skład zależą od płci i wieku. Ślina zawiera zarówno związki wytwarzane wewnątrz gruczołów ślinowych, jak i substancje zewnątrzgruczołowe, transportowane z osocza. W ostatnich latach coraz częściej wykorzystuje się ślinę jako podstawowy materiał w diagnostyce laboratoryjnej, szczególnie z powodu prostego, nieinwazyjnego i ekonomicznego sposobu jej pobierania. Możliwe jest już oznaczanie w ślinie leków, narkotyków, alkoholu, hormonów, mocznika, metali, niektórych immunoglobulin i cytokin [1, 2, 3, 4, 5]. Analityka diagnostyczna śliny jest nową, ale bardzo szybko rozwijającą się technologią.

Celem pracy było zbadanie wpływu częstości oczyszczania zębów, konsumpcji mleka, stosowania preparatów hormonalnych i palenia papierosów na zawartość jonów fluoru, wapnia, magnezu i fosforu w ślinie kobiet.

Material i metody

Do badań zakwalifikowano 100 kobiet w wieku 48–70 lat, średnia 54,98. Zebranie informacji na temat nawyków higieniczno-zdrowotnych pacjentek przeprowadzono na podstawie badania ankietowego. Pytania dotyczyły częstości oczyszczania zębów w ciągu dnia, konsumpcji mleka i jego przetworów, stosowania hormonalnych środków antykoncepcyjnych i hormonalnej terapii zastępczej (HTZ), występowania alergii oraz palenia papierosów.

W celu określenia zawartości jonów fluorkowych, wapniowych, fosforu i magnezu w ślinie od każdej pacjentki pobrano ok. 2 mL mieszanej śliny spoczynkowej, około 2 godziny po spożyciu śniadania. Ślinę całkowitą, niestymulowaną zbierano metodą odpluwania do sterylnych plastikowych probówek i szczelnie zamykano.

W celu przeprowadzenia analizy biochemicznej ślinę odwirowywano przy 4000 obr./min przez 15 minut, a następnie rozcieńczano buforem TISAB II w stosunku 1:1 i wodą destylowaną w stosunku 0,5 mL śliny : 5 mL wody. Tak rozcieńczone próby posłużyły do oznaczania wapnia i magnezu. Oznaczeń tych pierwiastków dokonano metodą spektrometrii atomowej przy użyciu spektrometru absorpcji atomowej PU 9100X marki Philips. Fosfor oznaczono spektrofotometrycznie za pomocą testu do oznaczania fosforu nieorganicznego firmy Randox Laboratories LTD (United Kingdom), opierającego się na reakcji tworzenia barwne-

go kompleksu fosforo-molibdenowego z wykorzystaniem aparatu Lambda 40 Perkin Elmer. Zawartość fluorków oznaczano metodą potencjometryczną przy użyciu elektrody jonoselektywnej firmy Orion.

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie wykorzystując pakiet statystyczny Statistica 6.0. Zastosowano następujące parametry: średnią wartość arytmetyczną, medianę, wartość minimalną i maksymalną, błąd standardowy wartości średnich. W celu określenia zależności pomiędzy dwoma badanymi parametrami wykonano analizę korelacji i obliczono współczynniki korelacji liniowej Pearsona. Analizę korelacji przeprowadzono pomiędzy wszystkimi badanymi parametrami. Do określenia istotności różnic między wartościami średnimi pomiarów zastosowano test t-Studenta, a w razie niespełnienia warunków normalności rozkładu test U Manna-Whitneya. Jako istotne statystycznie przyjęto różnice na poziomie $p < 0,05$.

Wyniki

W tabelach 1 i 2 przedstawiono informacje uzyskane w wyniku badania ankietowego. Większość kobiet wykazywała się dość wysoką dbałością o stan narządu zucia, co miało wyraz w częstym szczotkowaniu zębów. Dwukrotne szczotkowanie zębów w ciągu dnia podało 82% badanych. Wszystkie pacjentki stosowały do mycia zębów pasty fluororkowane. Konsumpcja mleka i jego przetworów, które są podstawowym źródłem wapnia w naszej diecie, w subiektywnej ocenie tylko 9% kobiet, była na poziomie wysokim. Większość pacjentek zgłosiła średni poziom konsumpcji mleka.

Tabela 1. Częstość szczotkowania zębów i konsumpcja mleka w badanej grupie

Table 1. Frequency of tooth-brushing and milk consumption

Parametr Parameter	Opis parametru Parameter value	n	Razem Total
Szczotkowanie zębów (dziennie) Tooth brushing (per day)	1	2	100
	2	82	
	3	14	
	> 3	2	
Konsumpcja mleka Milk consumption	niska / low	40	100
	średnia / medium	51	
	wysoka / high	9	

n – liczba badanych / number of subjects

Niewielka grupa pacjentek (16) używała hormonalnych środków antykoncepcyjnych, natomiast ponad połowa stosowała HTZ. Na alergię uskarżała się prawie jedna trzecia obserwowanych. Dość duża grupa kobiet (33) nałogowo paliła papierosy.

Wyniki biochemicznej analizy śliny przedstawiono w tabeli 3. Stężenia wszystkich badanych jonów w ślinie wykazywały duże wahania pomiędzy poziomem minimalnym i maksymalnym.

Pomiędzy poziomem ocenianych jonów w ślinie zaobserwowano wzajemne zależności, które przedstawiono

Tabela 2. Rozkład kobiet stosujących antykoncepcyjne środki hormonalne, hormonalną terapię zastępczą (HTZ), palących papierosy i zgłaszających alergie

Table 2. Characteristics of the group regarding oral contraceptives, hormone replacement therapy (HRT), smoking cigarettes and allergy

Parametr Parameter	Tak Yes	Nie No	Razem Total
Stosowanie antykoncepcji hormonalnej Use of oral contraceptives	16	84	100
HTZ / HRT	58	42	100
Papierosy / Smoking	33	67	100
Alergia / Allergy	32	68	100

Tabela 3. Zawartość jonów fluoru (F), wapnia (Ca), magnezu (Mg) i fosforu (P) w ślinie

Table 3. Content of fluoride (F), calcium (Ca), magnesium (Mg) and phosphorus (P) in saliva

Parametr Parameter	n	Średnia Mean	Mediana Median	Minimum	Maximum	SD
F (mg/kg = ppm)	100	0,34	0,17	0,05	2,95	0,52
Ca (mg/L)	100	53,59	29,85	15,69	280,63	53,09
Mg (mg/L)	100	5,60	4,40	0,99	36,08	5,07
P (mg/L)	100	135,38	129,38	74,21	399,93	41,86

n – liczba badanych / number of subjects; SD – odchylenie standardowe / standard deviation

Tabela 4. Wzajemne zależności pomiędzy zawartością ocenianych jonów w ślinie

Table 4. Relationships between the content of ions in saliva

Parametr Parameter	Mg śliny Salivary Mg			F śliny Salivary F		
	r	p	r ²	r	p	r ²
Ca śliny Salivary Ca	0,24	0,0429	0,06	brak none		
P śliny Salivary P	0,44	0,0001	0,19	-0,26	0,0268	0,07

p – poziom istotności różnic / level of significance; r – współczynnik korelacji / correlation coefficient; r² – współczynnik determinacji (%) / determination coefficient (%)

w tabeli 4. Stężenie jonów wapnia i fosforu rosło wraz ze wzrostem stężenia jonów magnezu, natomiast wzrostowi poziomowi jonów fluorkowych towarzyszył spadek zawartości jonów fosforu. Na stężenie badanych jonów w ślinie miała wpływ częstość szczotkowania zębów, palenie papierosów i stosowanie hormonalnych środków antykoncepcyjnych.

Częstsze szczotkowanie zębów powodowało spadek zawartości wapnia i fosforanów w ślinie, co zilustrowano w tabeli 5. Nie stwierdzono zależności pomiędzy częstością szczotkowania a stężeniem fluorków i jonów magnezu w ślinie.

Badanie wykazało, że palenie papierosów wpłynęło na zawartość jonów wapnia w ślinie. W ślinie pacjentek palą-

Tabela 5. Zawartość wapnia (Ca) i fosforu (P) w ślinie w zależności od częstości szczotkowania zębów

Table 5. Content of calcium (Ca) and phosphorus (P) in saliva in relationship to the frequency of tooth-brushing

Parametr Parameter	Szczotkowanie zębów (dziennie) Tooth-brushing (per day)			
	2 (n = 82)		3 (n = 14)	
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD
Ca w ślinie (mg/L) Salivary Ca (mg/L)	57,43	54,64	38,13	48,21
	p = 0,0263			
P w ślinie (mg/L) Salivary P (mg/L)	138,97	43,38	109,19	15,27
	p = 0,0013			

n – liczba badanych / number of subjects; p – poziom istotności różnic / level of significance; SD – odchylenie standardowe / standard deviation; \bar{x} – średnia arytmetyczna / arithmetic mean

Tabela 6. Wpływ palenia papierosów na zawartość jonów wapnia (Ca) w ślinie

Table 6. Cigarette smoking and calcium (Ca) content in saliva

Parametr Parameter	Palenie papierosów Smoking			
	palące smokers (n = 33)		niepalące non-smokers (n = 67)	
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD
Ca w ślinie (mg/L) Salivary Ca (mg/L)	63,41	63,67	48,75	47,06
	p = 0,0203			

n – liczba badanych / number of subjects; p – poziom istotności różnic / level of significance; SD – odchylenie standardowe / standard deviation; \bar{x} – średnia arytmetyczna / arithmetic mean

Tabela 7. Wpływ stosowania antykoncepcyjnych środków hormonalnych na zawartość fluorków (F) w ślinie

Table 7. Use of oral contraceptives and content of fluoride (F) in saliva

Parametr Parameter	Stosowanie antykoncepcji hormonalnej Use of oral contraceptives			
	tak / yes (n = 16)		nie / no (n = 84)	
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD
F w ślinie (mg/kg) Salivary F (mg/kg)	0,461	0,43	0,328	0,54
	p = 0,0234			

n – liczba badanych / number of subjects; p – poziom istotności różnic / level of significance; SD – odchylenie standardowe / standard deviation; \bar{x} – średnia arytmetyczna / arithmetic mean

cych papierosy stwierdzono statystycznie wyższe stężenie powyższych jonów. Zilustrowano to w tabeli 6.

U pacjentek stosujących wcześniej antykoncepcyjne środki hormonalne stwierdzono istotnie wyższy poziom fluorków w ślinie w porównaniu do kobiet nie używających tego rodzaju preparatów (tab. 7). Nie zaobserwowa-

no związku pomiędzy konsumpcją mleka, stosowaniem HTZ i występowaniem alergii a stężeniem badanych jonów w ślinie.

Dyskusja

W ślinie mieszanej utrzymuje się określone minimalne stężenie fluorków w granicach 0,01–0,05 ppm. Koncentracja fluorków w ślinie zależy od ilości związków fluoru wprowadzonych do jamy ustnej z wodą pitną, żywnością i napojami oraz profilaktycznymi preparatami fluoru [6, 7]. Yao i Grøn [8], badając zawartość fluorków w ślinie mieszanej i przysuszczonej, zauważyli, że ich poziom zależy od stężenia fluorków w wodzie pitnej. Przy optymalnym stężeniu fluorków w wodzie, wynoszącym 1,0 ppm, ich zawartość w ślinie mieszanej wynosi 0,33 ppm. Kuczyńska jako średni poziom fluorków w ślinie podaje 0,08–0,62 ppm [9]. Taką samą zawartość fluorków zaobserwowali Chmielnik i wsp. [10] u dzieci eksponowanych na oddziaływanie związków fluoru pochodzenia przemysłowego. Sjögren i Melin [11] oceniali wpływ nawyków płukania po szczotkowaniu zębów na retencję fluorków. Wyjściowe stężenia fluorków określone przez tych autorów w ślinie spoczynkowej wahały się dość znacznie 0,03–0,21 mmol/L (0,57–3,99 ppm). Zanotowany w badaniach własnych średni poziom fluorków (0,35 ppm) jest zatem zbliżony do obserwowanego przez innych autorów, a jego rozpiętości mogą wynikać z okresu czasu, jaki upłynął od szczotkowania zębów, rodzaju stosowanej pasty czy wahań pH śliny. Ciekawy, lecz zarazem trudny do wyjaśnienia jest wyższy poziom fluorków w ślinie kobiet stosujących doustne środki antykoncepcyjne.

W procesach buforowych śliny spoczynkowej dużą rolę odgrywają fosforany. W badanej grupie odnotowano nieco niższą średnią zawartość fosforu całkowitego (135,38 mg/L = 4,37 mmol/L) od stwierdzonej przez Ashleya i wsp. 4,99 mmol/L [12] oraz podaną przez Hölda i wsp. 5,5–14 mmol/L [13]. Z badań niektórych autorów wynika, że wraz ze spadkiem pH śliny istotnie obniża się zawartość fosforanów nieorganicznych oraz wzrasta podatność zębów na próchnicę [14, 15].

Stężenie magnezu w ślinie badanych pacjentek (5,6 mg/L = 0,23 mmol/L) było zbliżone do zaobserwowanego przez innych autorów [16, 17, 18].

Wapń jest jodem wydzielanym razem z białkami ślinowymi do światła gruczołów ślinowych, a jego całkowite stężenie w ślinie mieszanej waha się 1,5–2,0 mmol/L [13]. W badanej grupie zawartość wapnia w ślinie wynosiła średnio 53,59 mg/L = 1,34 mmol/L. Zaobserwowano, że u starszych kobiet na skład jonowy śliny duży wpływ ma palenie papierosów, które podnosi zawartość jonów wapnia, magnezu i potasu [19]. W badaniach własnych również stwierdzono wyższe stężenie jonów wapnia w ślinie kobiet palących papierosy w porównaniu do niepalących. Wzrostowi stężenia wapnia w ślinie towarzyszył wzrost zawartości

magnezu, o czym świadczy dodatnia korelacja pomiędzy tymi parametrami. Składniki dymu papierosowego hamują działanie estrogenów naturalnych i HTZ [20, 21], a także osi parathormon (PTH) – witamina D₃ [22], obniżając przez to absorpcję wapnia w jelicie. Kadm, który jest jednym ze składników dymu nikotynowego zwiększa wydalanie wapnia z moczem, zmniejsza syntezę aktywnego metabolitu witaminy D w nerkach i zaburza wbudowywanie wapnia do układu kostnego [23].

W ostatnich latach obserwuje się spadek spożycia pokarmów roślinnych i nabiału, zawierających wapń, na korzyść białka pochodzenia zwierzęcego, które intensyfikuje wydalanie wapnia. Spadek stężenia estrogenów we krwi kobiet po 50. r.ż. oraz niska podaż wapnia prowadzą do zmniejszenia zawartości wapnia w surowicy krwi. Stanowi to bodziec do wydzielania PTH, który powoduje zwiększoną resorpcję kości dążąc do wyrównania stężenia wapnia w surowicy. Obniżone stężenie wapnia we krwi powoduje również wzrost wytwarzania witaminy D, współdziałającej z PTH w intensyfikacji powstawania osteoklastów, co potęguje utratę masy kostnej. W przewlekłych niedoborach wapnia stężenie parahormonu w surowicy jest ciągle zwiększone i stale odbywają się procesy niszczenia kości. Przewaga procesów resorpcyjnych w kości spotęgowana działaniem składników dymu papierosowego jest prawdopodobną przyczyną wzrostu stężenia wapnia w ślinie. Rapuri i wsp. [24], badając populację kobiet w wieku 65–77 lat, zaobserwowali u palących papierosy znacznie niższą gęstość mineralną kości, absorpcję wapnia i stężenie witaminy D w surowicy w stosunku do niepalących. U pacjentek palących stwierdzono w surowicy wzrost stężenia PTH, markerów przybudowy kości i osteokalcyny. Autorzy wysuwają wniosek, że palenie papierosów wpływa na obniżenie gęstości mineralnej kości, której przyczyną jest spadek absorpcji wapnia związany z wtórną nadczynnością przytarczyc i nasilenie procesów resorpcyjnych. Inne możliwe wyjaśnienie podwyższonego poziomu jonów wapnia w ślinie palaczy podają Khan i wsp. [25]. Sugerują oni, że palenie papierosów powoduje obniżenie pH śliny, co uruchamia procesy buforowe i prowadzi do dyfuzji części wapnia z kamienia nazębnego, a nawet szkliwa zębów do śliny. Jony wapnia w szkliwie zębów i kamieniu nazębnym są związane z jonami fosforanowymi w postaci hydroksyapatytu, fluorohydroksyapatytu i fosforanu wapnia. Wzrostowi stężenia jonów wapnia w ślinie powinien zatem towarzyszyć wzrost zawartości jonów fosforanowych, jednak w badaniach własnych bezpośrednio nie zaobserwowano takiej korelacji. Można natomiast zaobserwować, że stężenie jonów wapnia korelowało ze stężeniem jonów magnezu a to z kolei z zawartością jonów fosforu. Pomiędzy stężeniem fosforanów i fluorków wystąpiła ujemna korelacja, co potwierdza większą odporność fluorohydroksyapatytu szkliwa na działanie kwaśnego środowiska w porównaniu do fosforanu wapnia i hydroksyapatytu.

Wpływ częstszego szczotkowania zębów na spadek zawartości jonów wapnia i fosforu można wytłumaczyć

eliminacją tych jonów ze środowiska jamy ustnej w wyniku tej czynności, szczególnie że powszechne jest końcowe płukanie wodą. Badania wykazały, że płukanie jamy ustnej wodą po szczotkowaniu zębów znacznie obniża zawartość fluorków w ślinie [11, 26].

Wnioski

1. Na stężenie badanych jonów w ślinie wpływ ma częstota szczotkowania zębów, palenie papierosów i stosowanie hormonalnych środków antykoncepcyjnych.

2. Częstsze szczotkowanie zębów powoduje spadek zawartości jonów wapnia i fosforu w ślinie.

3. W ślinie pacjentek palących papierosy występuje statystycznie wyższe stężenie jonów wapnia.

4. Stosowanie antykoncepcyjnych środków hormonalnych ma związek ze wzrostem poziomu fluorków w ślinie.

Piśmiennictwo

1. *Haeckel R., Hänecke P.*: The application of saliva, sweat and tear fluid for diagnostic purposes. *Ann. Biol. Clin.* 1993, 51, 903–910.
2. *Cyprysiak G., Tadeusiak W.*: Zastosowanie śliny w diagnostyce medycznej. *Nowa Stom.* 2001, 16, 33–36.
3. *Shirtcliff E.A., Granger D.A., Schwartz E.B., Curran M.J., Booth A., Overman W.H.*: Assessing estradiol in biobehavioral studies using saliva and blood spots: simple radioimmunoassay protocols, reliability, and comparative validity. *Horm. Behav.* 2000, 38, 137–147.
4. *Granger D.A., Schwartz E.B., Booth A., Curran M., Zakaria D.*: Assessing dehydroepiandrosterone in saliva: a simple radioimmunoassay for use in studies of children, adolescents and adults. *Psychoneuroendocrinology*, 1999, 24, 567–579.
5. *Cook C.*: Rapid noninvasive measurement of hormones in transdermal exudate and saliva. *Physiol. Behav.* 2002, 75, 169–181.
6. *Sjögren K., Birkhed D., Persson L.G., Norén J.G.*: Salivary fluoride clearance after a single intake of fluoride tablets and chewing gums in children, adults, and dry mouth patients. *Scand. J. Dent. Res.* 1993, 101, 274–278.
7. *Tenovuo J., Hurme T., Ahola A., Svedberg C., Ostela I., Lenander-Lumikari M. et al.*: Release of cariostatic agents from a new buffering fluoride- and xylitol-containing lozenge to human whole saliva. *J. Oral Rehabil.* 1997, 24, 325–331.
8. *Yao K., Grøn P.*: Fluoride concentration in duct saliva and whole saliva. *Caries Res.* 1970, 4, 321–331.
9. *Kuczyńska E.*: *Metabolizm fluoru*, PWN, Warszawa–Poznań, 1982, 41.
10. *Chmielnik M., Borysewicz-Lewicka M., Rydzewska A., Kaniewski A.*: Nieprawidłowości budowy szkliwa zębowego oraz poziom fluorków w szkliwie, ślinie i płytce nazębnej u dzieci eksponowanych od urodzenia na oddziaływanie związków fluoru pochodzenia przemysłowego. *Czas. Stomatol.* 1983, 36, 103–108.
11. *Sjögren K., Melin N.H.*: The influence of rinsing routines on fluoride retention after toothbrushing. *Gerodontology*, 2001, 18, 15–20.
12. *Ashley F.P., Coward P.Y., Jalil R.A., Wilson R.F.*: Relationship between calcium and inorganic phosphorus concentrations of both resting and stimulated saliva and dental plaque in children and young adults. *Arch. Oral Biol.* 1991, 36, 431–434.
13. *Höld K.M., de Boer D., Zuidema J., Maes R.A.*: Saliva as an analytical tool in toxicology. *Int. J. Dig. Typogr.* 1995, 1, 1–36.
14. *Sahannon I.L.*: Parotid fluid flow rate, parotid fluid and serum inorganic phosphate concentrations as related to dental caries status in man. *J. Dent. Res.* 1964, 43, 1029–1038.
15. *Kochańska B., Borowska-Afeltowicz E.*: Stężenie fosforanów nieorganicznych w ślinie spoczynkowej mieszanej a podatność na próchnicę. *Czas. Stomatol.* 1996, 49, 665–671.
16. *Wilson R.F., Ashley F.P.*: Relationships between the biochemical composition of both free smooth surface and approximal plaque and salivary composition and a 24-hour retrospective dietary history of sugar intake in adolescents. *Caries Res.* 1990, 24, 203–210.
17. *Buczowska-Radlińska J.*: Czynniki modyfikujące procesy de- i remineralizacji szkliwa zębów w aspekcie podatności na próchnicę zębów. *Ann. Acad. Med. Stetin.* 1999, Suppl. 47.
18. *Gilfrich H.J., Engel H.J., Prellwitz W.*: Magnesium concentration in saliva – an indicator of digitalis toxicity? *Klin. Wochenschr.* 1981, 59, 617–621.
19. *Laine M.A., Sewon L.A., Karjalainen S.M., Helenius H., Doroguinakaia A.*: Salivary variable in relation to tobacco smoking and female sex steroid hormone-use in 3- to 59-year-old women. *Acta Odontol. Scand.* 2002, 60, 237–240.
20. *Mueck A.O., Seeger H.*: Smoking, estradiol metabolism and hormone replacement therapy. *Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents*, 2005, 3, 45–54.
21. *Bjarnason N.H., Chistiansen C.*: The influence of thinness and smoking on bone loss and response to hormone replacement therapy in early postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000, 85, 590–596.
22. *Need A.G., Kemp A., Giles N., Morris H.A., Horowitz M., Nordin B.E.*: Relationship between intestinal calcium absorption, serum vitamin D metabolites and smoking in postmenopausal women. *Osteoporos. Int.* 2002, 13, 83–88.
23. *Marcinowska-Suchowierska E.*: *Osteoporoza, diagnostyka, profilaktyka i leczenie*. PZWL, Warszawa 1999.
24. *Rapuri P.B., Gallagher J.C., Balhorn K.E., Ryschon K.L.*: Smoking and bone metabolism in elderly women. *Bone*, 2000, 27, 429–436.
25. *Khan G.J., Mehmood R., Salah-ud-Din, Marwat F.M., Ihtesham-ul-Haq, Jamil-ur-Rehman*: Secretion of calcium in the saliva of long-term tobacco users. *J. Ayub Med. Coll. Abbottabad*, 2005, 17, 60–62.
26. *Sjögren K., Ekstrand J., Birkhed D.*: Effect of water rinsing after tooth brushing on fluoride ingestion and absorption. *Caries Res.* 1994, 28, 455–459.

KATARZYNA GROCHOLEWICZ, ELŻBIETA WEYNA, IZABELA GUTOWSKA¹, IWONA NOCEN²

SKŁAD MINERALNY SZKLIWA ZĘBÓW A GŁĘBOKOŚĆ BIOPSI I STAN UZĘBIENIA KOBIET W WIEKU POMENOPAUAZALNYM

MINERAL CONTENT OF ENAMEL, DEPTH OF BIOPSY, AND DENTITION STATUS IN POSTMENOPAUSAL WOMEN

Zakład Stomatologii Ogólnej Pomorskiej Akademii Medycznej
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin

Kierownik: prof. dr hab. n. med. *Elżbieta Weyna*

¹ Zakład Biochemii, Katedra Biochemii i Chemii Medycznej Pomorskiej Akademii Medycznej

al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin

Kierownik: prof. dr hab. n. med. *Dariusz Chlubek*

² Zakład Chemii Medycznej, Katedra Biochemii i Chemii Medycznej Pomorskiej Akademii Medycznej

al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin

Kierownik: dr hab. n. med. *Joanna Bober*

Summary

Purpose: The study was designed to evaluate the relationship between the content of fluoride, magnesium and phosphorus in enamel, depth of biopsy, and dentition status in postmenopausal women.

Material and methods: Dentition status in 81 postmenopausal women aged 48–70 years (mean 54.98 years) was determined using the Decayed, Missing and Filled Surfaces (DMFS) index. Double-layer superimposed acid biopsies were used for sampling labial enamel of upper permanent central incisor. Biochemical analysis was performed to determine the content of fluoride, magnesium, and phosphorus. Assuming that enamel contains 37% calcium, enamel mass, layer thickness, biopsy depth and concentrations of ions in the surface and subsurface layer were calculated. Correlation analysis was done to disclose relationships between the parameters studied.

Conclusions: It was observed that the concentration of ions decreased with growing depth of biopsy. Decreasing depth of biopsy correlated with increasing concentration of fluorides and magnesium in surface and subsurface layer of enamel. The total depth of biopsy correlated more exactly with the concentration of fluorides and magnesium in subsurface layer than in surface layer. Increasing concentration of fluoride was associated with increasing concentration of magnesium. No correlation was observed between DMFS and the depth of enamel biopsy.

Key words: dental enamel – acid biopsy – fluoride, magnesium and phosphorus ions – dentition status.

Streszczenie

Wstęp: Celem pracy była ocena wpływu składu mineralnego szkliwa zębów na głębokość biopsji i stanu uzębienia u kobiet po menopauzie.

Material i metody: U 81 kobiet w wieku 48–70 lat (średnia 54,98) oceniono stan zębów za pomocą liczb Pp, Up, Wp i PUWp oraz określono stężenie jonów fosforu, magnezu i fluorków w szkliwie zębów. W tym celu od każdej z pacjentek pobrano mikropróbki szkliwa siekacza centralnego z dwóch warstw, powierzchniowej i podpowierzchniowej, metodą biopsji kwasowej i poddano analizie biochemicznej. Przy założeniu stałej, 37% zawartości wapnia, obliczono masę, a następnie grubość kolejnych warstw szkliwa oraz głębokość biopsji i stężenie badanych jonów w każdej warstwie. W celu określenia zależności pomiędzy badanymi parametrami wykonano analizę korelacji.

Wnioski: Wyniki badań wykazały, że wysycenie szkliwa obserwowanymi jonami malało wraz z głębokością biopsji. Spadek głębokości biopsji powierzchniowej i podpowierzchniowej warstwy szkliwa korelował ze wzrostem stężenia jonów fluorkowych i magnezu. Na całkowitą głębokość

biopsji większy wpływ miała zawartość powyższych jonów w warstwie podpowierzchniowej szkliwa niż w warstwie powierzchniowej. Wzrostowi stężenia fluorków w szkliwie towarzyszyła wysoka koncentracja jonów magnezu. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy PUWp a głębokością biopsji.

H a s ł a: szkliwo zębów – biopsja kwasowa – jony fluoru, magnezu i fosforu – stan zębów.

Wstęp

W szkliwie zębów wyróżnia się część organiczną i mineralną, która stanowi 96% jego masy. Głównie występują tu hydroksyapatyty, czyli sole wapniowo-fosforanowe. W sieci krystalicznej hydroksyapatytu mogą występować grupy hydroksylowe, fosforanowe lub jony fluoru, magnezu, sodu, cynku i inne. Jony te mogą być wbudowane w szkliwo w wyniku działań profilaktycznych lub jako wynik zanieczyszczeń środowiska [1, 2]. Ich obecność wpływa na zmianę właściwości fizykochemicznych szkliwa, takich jak mikrotwardość, gęstość czy podatność na rozpuszczanie w kwasach [3, 4, 5]. Różne są doniesienia na temat związków powyższych zmian z podatnością na próchnicę [6, 7, 8].

Celem pracy było określenie wpływu składu mineralnego szkliwa u kobiet w wieku pomenopauzalnym na głębokość jego biopsji i stan uzębienia.

Material i metody

Badaniu poddano 81 kobiet w wieku 48–70 lat, średnia 54,98. W klinicznym badaniu stomatologicznym, przy użyciu lusterka i zgłębnika, oceniono stan zębów zgodnie z kryteriami Światowej Organizacji Zdrowia, określając liczbę powierzchni z próchnicą (Pp), usuniętych (Up) i wypełnionych (Wp) [9].

Do oceny zawartości jonów fosforu, magnezu i fluorków w szkliwie zębów od każdej z pacjentek pobrano mikropróbki szkliwa siekacza centralnego z dwóch warstw, powierzchniowej i podpowierzchniowej, metodą biopsji kwasowej, opisaną przez *Schamschula i wsp.* [10]. Przed pobraniem próbki powierzchnia zęba była oczyszczana za pomocą ręcznych narzędzi stomatologicznych, przemywana i osuszana powietrzem. Na tak przygotowanej i odizolowanej powierzchni wargowej zęba, w odległości około 5 mm od brzegu siecznego, centralnie umieszczano taśmę przylegającą z otworem o średnicy 2,5 mm, który ograniczał pole biopsji o powierzchni 4,9 mm². Z tego samego pola pobierano dwa bioptaty. Próbką powierzchniowa (warstwa I) była pobierana przez umieszczenie 5 µL 0,125 molowego HNO₃ na polu biopsji i następnie po 30 sekundach splukana 1 mL buforu TISAB (Orion cat. № 940909), rozcieńczonego wodą podwójnie destylowaną

w stosunku 1:2. Po osuszeniu i kontroli szczelności taśmy pobierano podpowierzchniową mikropróbkę szkliwa (warstwa II). Biopsji dokonywano w ten sam sposób, ale z użyciem 0,500 molowego HNO₃. Próbkę szkliwa zbierane były do probówek firmy Eppendorf typu Safe-Lock i szczelnie zamykane.

Wapń i magnez w bioptatach oznaczano bezpośrednio z dostarczonej próby, bez rozcieńczania, metodą spektrometrii atomowej, przy użyciu spektrometru absorpcji atomowej PU 9100X marki Philips. Fosfor oznaczono spektrofotometrycznie za pomocą testu do oznaczania fosforu nieorganicznego firmy Randox Laboratories LTD United Kingdom, opierającego się na reakcji tworzenia barwnego kompleksu fosforo-molibdenowego z wykorzystaniem aparatu Lambda 40 Perkin Elmer. Zawartość fluorków oznaczano po rozcieńczeniu próbki bioptatu 0,5 mL wody destylowanej i 0,5 mL roztworu TISAB II, i w tak przygotowanych roztworach oznaczano fluorki metodą potencjometryczną, przy użyciu elektrody jonoselektywnej firmy Orion. Pomiaru dokonywano po 5 minutach, a następnie dodawano odpowiedni roztwór wzorcowy NaF w ilości 0,1 mL i powtórnie dokonywano pomiaru po 5 minutach. Różnica potencjałów przed i po dodaniu wzorca stanowiła podstawę do obliczeń ilości fluorków. Analizy biochemiczne śliny i szkliwa zębów przeprowadzono w Zakładzie Chemii Medycznej Pomorskiej Akademii Medycznej.

Przy założeniu stałej, 37% zawartości wapnia, obliczono masę, a następnie grubość kolejnych warstw szkliwa, przyjmując że przestrzeń biopsji ma kształt cylindryczny, a gęstość szkliwa w obszarze badania jest stała i wynosi 2,95 g/cm³, wg wzoru:

$$\text{grubość warstwy } (\mu\text{m}) = \frac{\text{masa szkliwa w próbce}}{\text{pole biopsji } (\text{mm}^2) \times 2,95 \text{ (g/cm}^3\text{)}}$$

Na podstawie uzyskanych wartości grubości poszczególnych warstw obliczono głębokości biopsji szkliwa. Centralna głębokość biopsji powierzchniowej warstwy szkliwa (warstwa I) jest połową jej całkowitej grubości, natomiast głębokość warstwy podpowierzchniowej (warstwa II) jest sumą połowy jej grubości i całkowitej grubości warstwy powierzchniowej. Głębokość całkowitą uzyskano przez dodanie całkowitych grubości obu warstw szkliwa.

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie wykorzystując pakiet statystyczny Statistica 6.0. Zastosowano następujące parametry: średnią wartość arytmetyczną, medianę, wartość minimalną i maksymalną, błąd standardowy wartości średnich. W celu określenia zależności pomiędzy dwoma badanymi parametrami wykonano analizę korelacji i obliczono współczynniki korelacji liniowej Pearsona. Analizę korelacji przeprowadzono pomiędzy wszystkimi badanymi parametrami. Do określenia istotności różnic między wartościami średnimi pomiarów zastosowano test t-Studenta, a w razie niespełnienia warunków normalności rozkładu test U Manna-Whitneya. Jako istotne statystycznie przyjęto różnice na poziomie $p < 0,05$.

Wyniki

Na podstawie zawartości wapnia w biopatach obliczono masę szkliwa w pobranej próbce, a następnie zawartość jonów fluoru, fosforu i magnezu w powierzchniowej i podpowierzchniowej warstwie szkliwa. Wyniki tej analizy zebrano w tabeli 1. Wysycenie szkliwa obserwowanymi jonami malało wraz z głębokością biopsji.

Tabela 1. Zawartość fluorków (F), fosforu (P) i magnezu (Mg) w powierzchniowej (I) i podpowierzchniowej (II) warstwie szkliwa

Table 1. Content of fluoride (F), phosphorus (P) and magnesium (Mg) in the surface (I) and subsurface (II) layer of enamel

Parametr Parameter	n	Średnia Mean	Mediana Median	Minimum	Maximum	SD
F (mg/kg = ppm) I warstwa Layer I	81	11 419,81	10 804,91	1439,72	33 061,78	7453,42
F (mg/kg = ppm) II warstwa Layer II	81	6452,60	4775,80	937,00	45 125,00	6604,00
P (g/kg) I warstwa Layer I	81	345,26	307,76	148,39	878,50	151,78
P (g/kg) II warstwa Layer II	81	335,35	330,24	38,66	580,10	95,34
Mg (g/kg) I warstwa Layer I	81	10,84	8,84	3,07	31,18	6,53
Mg (g/kg) II warstwa Layer II	81	6,05	4,02	1,48	46,78	6,27

n – liczba badanych / number of subjects; SD – odchylenie standardowe / standard deviation

W podpowierzchniowej warstwie szkliwa zauważono wzajemne korelacje pomiędzy jonami fluoru, magnezu i fosforu, co zilustrowano w tabeli 2. Stężenie fluorków było bardzo silnie skorelowane z zawartością jonów magnezu i średnio skorelowane z poziomem jonów fosforu. Średnia korelacja wystąpiła również pomiędzy zawartością jonów fosforu i magnezu w tej warstwie szkliwa. Nie stwierdzono podobnych korelacji w powierzchniowej warstwie szkliwa.

Głębokości biopsji powierzchniowej (I warstwa) i podpowierzchniowej (II warstwa) warstwy szkliwa oraz głębokość całkowitą zilustrowano w tabeli 3. Średnia głębokość całkowita biopsji jest odzwierciedleniem średniej głębokości warstwy podpowierzchniowej.

W tabeli 4 przedstawiono zależności, jakie zaobserwowano pomiędzy stężeniem badanych jonów w szkliwie a głębokością biopsji. Głębokość biopsji szkliwa zależała głównie od zawartości w nim jonów magnezu i fluorkowych. Spadek stężenia tych jonów w obu warstwach szkliwa wiązał się ze wzrostem głębokości biopsji, przy czym na głębokość całkowitą trawienia większy wpływ miało wysycenie powyższymi jonami warstwy podpowierzchniowej. Koncentracja jonów fosforu wykazała niewielki wpływ na głębokość biopsji tylko w powierzchniowej warstwie szkliwa.

Tabela 2. Wzajemne zależności pomiędzy zawartością badanych jonów w podpowierzchniowej warstwie szkliwa

Table 2. Relationships between ion content in subsurface layer of enamel

Parametr Parameter	F			Mg		
	r	p	r ²	r	p	r ²
Mg	0,78	0,0000	0,61			
P	0,30	0,0105	0,09	0,31	0,0078	0,098

p – poziom istotności różnic / level of significance; r – współczynnik korelacji / correlation coefficient; r² – współczynnik determinacji (%) / determination coefficient (%)

Tabela 3. Głębokość biopsji powierzchniowej (I) i podpowierzchniowej (II) warstwy szkliwa

Table 3. Depth of surface (I) and subsurface (II) layer of enamel

Parametr Parameter	n	Średnia Mean	Mediana Median	Minimum	Maximum	SD
Głębokość biopsji (μm) I warstwa Depth of biopsy (μm) Layer I	81	0,42	0,41	0,07	0,97	0,20
Głębokość biopsji (μm) II warstwa Depth of biosy (μm) Layer II	81	1,90	1,81	0,36	3,86	0,79
Głębokość biopsji całkowita (μm) Total depth of biosy (μm)	81	2,95	2,76	0,45	7,01	1,39

n – liczba badanych / number of subjects; SD – odchylenie standardowe / standard deviation

W tabeli 5 przedstawiono wyniki oceny zębów liczbami Pp, Up, Wp i PUWp. Zaobserwowano duże wahania określanych liczb. Średnia liczba powierzchni zaatakowanych próchnicą była dość niska, chociaż osiągnęła maksymalną wartość 6,00.

W tabeli 6 ukazano korelacje, jakie wystąpiły pomiędzy stanem uzębienia a stężeniem jonów magnezu i fosforu w szkliwie. Liczba PUWp rosła, gdy wzrastała koncentracja jonów magnezu w powierzchniowej warstwie szkliwa i fosforu w warstwie podpowierzchniowej.

Dyskusja

Jony fosforu związane są w szkliwie z jonami wapnia w hydroksyapatycie lub jego amorficznej postaci, fosforanie wapnia i stanowią wg *Lindha* i *Tveita* [11] ok. 17,7% jego frakcji nieorganicznej. W badanej grupie średnia zawartość tych jonów w szkliwie była wyższa i wynosiła 340 g/kg, co stanowi 32,64% frakcji nieorganicznej. Wysycenie szkliwa jonami magnezu malało wraz z głębokością i średnio stanowiło 0,81% substancji nieorganicznych. Było zatem dwukrotnie wyższe od podanego przez *Lindha* i *Tveita* [11]. Podobną zawartość jonów magnezu w powierzchniowej warstwie szkliwa (366 mmol/kg = 8,89 g/kg) stwierdzili *Łagocka* i *wsp.* [12], ale stężenie tych jonów rosło wraz z głębokością biopsji. *Jakubowska* [13] natomiast, podobnie

Tabela 4. Zależność głębokości biopsji szkliwa od zawartości jonów fluoru (F), fosforu (P) i magnezu (Mg)
Table 4. Relationship of depth of enamel biopsy to the content of fluorides (F), phosphorus (P) and magnesium (Mg)

Parametr Parameter	Głębokość biopsji warstwa I Depth of biopsy layer I			Głębokość biopsji warstwa II Depth of biopsy layer II			Głębokość biopsji całkowita Total depth		
	r	p	r ²	r	p	r ²	r	p	r ²
F warstwa I F layer I	-0,54	0,0000	0,29				-0,30	0,0089	0,09
F warstwa II F layer II				-0,51	0,0000	0,32	-0,57	0,0000	0,32
P warstwa I P layer I	-0,22	0,0431	0,05				brak none		
P warstwa II P layer II				brak none			brak none		
Mg warstwa I Mg layer I	-0,71	0,0000	0,50				-0,23	0,0337	0,06
Mg warstwa II Mg layer II				-0,57	0,0000	0,32	-0,58	0,0000	0,34

p – poziom istotności różnic / level of significance; r – współczynnik korelacji / correlation coefficient; r² – współczynnik determinacji / determination coefficient (%)

Tabela 5. Liczby Pp, Up, Wp i PUWp w badanej grupie
Table 5. Mean DS, MS, FS and DMFS in observed group

Parametr Parameter	n	Średnia Mean	Mediana Median	Minimum	Maximum	SD
Pp DS	81	0,79	0,00	0,00	6,00	1,40
Up MS	81	44,88	40,00	0,00	90,00	21,36
Wp FS	81	32,68	33,00	5,00	81,00	15,31
PUWp DMFS	81	78,35	80,00	24,00	136,00	22,21

n – liczba badanych / number of subjects; SD – odchylenie standardowe / standard deviation

Tabela 6. Zależność pomiędzy PUWp a stężeniem jonów magnezu (Mg) i fosforu (F) w szkliwie

Table 6. Relationship between DMFS and the concentration of magnesium (Mg) and phosphorus (F) in enamel

Parametr Parameter	PUWp DMFS		
	r	p	r ²
Mg szkliwa warstwa I Enamel Mg layer I	0,30	0,0188	0,09
P szkliwa warstwa II Enamel P layer II	0,26	0,0426	0,07

p – poziom istotności różnic / level of significance; r – współczynnik korelacji / correlation coefficient; r² – współczynnik determinacji (%) / determination coefficient (%)

do obserwacji własnych, również stwierdziła spadek zawartości tych jonów w miarę wzrostu głębokości trawienia. Zarówno *Jakubowska* [13], jak i *Sendur* [14], wykazały większą zawartość tego pierwiastka w szkliwie zębów osób starszych, co mogłoby wskazywać na kumulację magnezu w szkliwie w ciągu życia. W badanej grupie pacjentek zaobserwowano stosunkowo wysokie stężenie jonów fluorkowych w szkliwie. Wysycenie szkliwa tymi jonami zależy w głównej mierze od ekspozycji rozwijających się zębów na fluor i wzrasta z wiekiem [4, 10]. Wykazano znaczny

wzrost stężenia jonów fluorkowych w szkliwie w wyniku stosowania kontaktowego jego preparatów profilaktycznych i większej koncentracji w wodzie pitnej [15, 16, 17]. Do niedawna obserwowane było w Szczecinie i okolicach duże zanieczyszczenie fluorkami wszystkich komponentów środowiska. Zakłady Chemiczne „Police”, położone na północ od Szczecina, w latach 1977–1996 emitowały do atmosfery 12,7–97 ton (średnia 46,5) związków fluoru rocznie [18, 19, 20]. Dodatkowo w ramach profilaktyki próchnicy w Szczecinie fluorkowana była woda pitna od roku 1968 do drugiej połowy lat 80. ubiegłego wieku. Związki te, działając endo- i egzogenicznie, prawdopodobnie wpłynęły na znacznie wyższe stężenie jonów fluoru w szkliwie badanych kobiet w porównaniu do badań innych autorów. Najczęściej też badania zawartości fluorków w szkliwie prowadzone są u dzieci lub nieco innymi metodami, co utrudnia porównanie wyników. Ponadto, na głębokość biopsji i na stężenie fluorków w pobieranych próbkach mogą mieć wpływ: różnice w porowatości szkliwa, zawartość składników mineralnych i ich podatność na rozpuszczanie.

Wysoka zawartość składników mineralnych w badanych próbkach spowodowała, że uzyskane w wyniku trawienia szkliwa, grubości warstw i głębokości biopsji są bardzo niewielkie. Podobnie do obserwacji *Jakubowskiej* [13] i *Buczkowskiej-Radlińskiej* [21], również najtrudniej trawieniu poddawała się powierzchniowa warstwa szkliwa. *Grobler i wsp.* [22] sugerują, że jednym z czynników odpowiedzialnych za rozpuszczanie w kwasach jest fluorek związany strukturalnie w postaci fluorohydroksyapatytów i fluoroapatytów, a nie fluorek wapnia. Silne ujemne korelacje pomiędzy głębokością biopsji szkliwa a koncentracją jonów magnezu i fluoru potwierdzają odporność na działanie kwasów. *Jakubowska* również uzyskała ujemne korelacje pomiędzy tymi parametrami [13]. Odnosząc wykazane zależności do sugestii *Groblera i wsp.* [22], można przypuszczać, że w badanych próbkach szkliwa fluor występował głównie w postaci fluorohydroksyapatytów i fluoroapatytów. Powierzchniowa warstwa szkliwa trudniej ulegała

trawieniu, a całkowita głębokość biopsji silnie korelowała z zawartością jonów magnezu i fluorkowych warstwy podpowierzchniowej. Głębokość trawienia tej warstwy była nieco słabiej skorelowana z koncentracją tych jonów niż głębokość biopsji warstwy powierzchniowej. Na podatność szkliwa na rozpuszczanie w kwasach ma również wpływ jego mikrotwardość i gęstość, które ulegają stopniowemu obniżeniu w kierunku od powierzchni do połączenia szkliwno-zębinowego, co może być przyczyną większej odporności warstwy powierzchniowej na działanie kwasów. Jednocześnie w podpowierzchniowej warstwie szkliwa odnotowano bardzo silną korelację pomiędzy zawartością jonów magnezu i fluoru. Stwierdzono, że wysokiej zawartości fluorków w szkliwie zębów dzieci, mieszkających w strefie skażenia atmosfery związkami fluoru, towarzyszy wzrost stężenia jonów wapnia, magnezu i fosforu [23]. Długoletnim narażeniem na działanie związków fluoru w wyniku zanieczyszczenia środowiska naturalnego można by więc wytłumaczyć nie tylko podwyższony poziom fluorków w szkliwie, ale również większe stężenie jonów magnezu i fosforu u badanych kobiet. Zbliżone wyniki biopsji szkliwa uzyskali Schamschula i wsp. [10], którzy badając szkliwo dzieci 7–9-letnich również zaobserwowali związek pomiędzy stężeniem fluorków w szkliwie a głębokością trawienia. Szkliwo dzieci ma większą podatność na trawienie niż szkliwo dorosłych, co jest związane z jego posteryptywnym dojrzewaniem, stąd wynikają niewielkie różnice pomiędzy wynikami badań własnych oraz Schamschula i wsp. [10].

Gorszy stan uzębienia, wyrażony wyższą liczbą PUWp, korelował z większą zawartością jonów magnezu w powierzchniowej warstwie szkliwa i jonów fosforu w warstwie podpowierzchniowej. Nie zaobserwowano zależności pomiędzy wysyceniem szkliwa fluorkami a stanem zębów. Niektóre badania również nie potwierdziły istnienia korelacji między zawartością fluorków w szkliwie a próchnicą zębów [24, 25]. Próbkę szkliwa do analizy biochemicznej pobierane są ze zdrowych powierzchni siekaczy i zawartość fluorków w tych próbkach może nie odzwierciedlać stężenia fluorków w szkliwie zębów podatnych na próchnicę. W związku z wieloczynnikową etiologią próchnicy, trudno jest wykazać bezpośredni związek pomiędzy składem mineralnym szkliwa a stanem zębów. Nie stwierdzono również korelacji pomiędzy PUWp a głębokością biopsji. Brown i wsp. [7] uważają, że szkliwo, które szybciej się rozpuszcza, nie zawsze jest bardziej podatne na próchnicę, zwłaszcza w badaniach in vivo.

Wnioski

1. Głębokość biopsji powierzchniowej i podpowierzchniowej warstwy szkliwa maleje ze wzrostem stężenia jonów fluorkowych i magnezu.

2. Na całkowitą głębokość biopsji większy wpływ ma zawartość powyższych jonów w warstwie podpowierzchniowej szkliwa niż w warstwie powierzchniowej.

3. Wzrostowi stężenia fluorków w szkliwie towarzyszy wysoka koncentracja jonów magnezu.

4. Brak jest jednoznacznego związku pomiędzy składem mineralnym szkliwa a próchnicą zębów.

Piśmiennictwo

1. Machoy Z.: Fluor w środowisku – mechanizmy korzystnego i szkodliwego oddziaływania. Materiały XXI Zjazdu Pol. Tow. Bioch. Kraków 1996, 33.
2. Terpstra R.A., Driessenes M.: Magnesium in tooth enamel and synthetic apatites. *Calcif. Tissue Int.* 1986, 39, 348–354.
3. Lussi A., Jaeggi T.: The erosive potential of various oral care products compared to foodstuffs and beverages. *Schweiz. Monatsschr. Zahnmed.* 2001, 111, 274–281.
4. Schemehorn B.R., Orban J.C., Wood G.D., Fischer G.M., Winston A.E.: Remineralization by fluoride enhanced with calcium and phosphate ingredients. *J. Clin. Dent.* 1999, 10, 13–16.
5. Lakomaa E.L., Rytömaa I.: Mineral composition of enamel and dentin of primary and permanent teeth in Finland. *Scand. J. Dent. Res.* 1977, 85, 89–95.
6. Schamschula R.G., Agus H.M., Charlton G., Duppenhaler J.L., Un P.S.: Associations between fluoride concentrations in successive layers of human enamel and individual dental caries experience. *Arch. Oral Biol.* 1979, 24, 847–852.
7. Brown W.E., Gregory T.M., Chow L.C.: Effects of fluoride on enamel solubility and cariostasis. *Caries Res.* 1977, 11, Suppl. 1, 118–141.
8. Luoma H., Nuuja I., Collan Y., Nummikoski P.: The effect of magnesium and fluoride on nephrocalcinosis and aortic calcification in rats given high sucrose diets with added phosphates. *Fluoride*, 1978, 11, 41–42.
9. World Health Organization. *Oral Health Surveys, Basic Methods* 4th edn. Geneva 1997, 36–39.
10. Schamschula R.G., Sugar E., Agus H.M., Un P.S., Toth K.: The fluoride content of human tooth enamel in relation to environmental exposure to fluoride. *Aust. Dent. J.* 1982, 27, 243–247.
11. Lindh U., Tveit A.B.: Proton microprobe determination of fluoride depth distributions and surface multielement characterization in dental enamel. *J. Radioanal. Chem.* 1980, 59, 167–173.
12. Łagocka R., Opalko K., Ogoński T.: Zawartość fluorków i magnezu w powierzchniowych warstwach szkliwa ludzkich zębów stałych (badania in vitro). *Materiały VIII Sympozjum Fluorowego, Szczecin* 1998, 52–57.
13. Jakubowska K.: Zastosowanie kwasowej biopsji szkliwnej w badaniach składu mineralnego szkliwa stałych zębów ludzkich przy uwzględnieniu wieku osobniczego i warunków środowiska. *Ann. Acad. Med. Stein.* 2002, 48, 213–230.
14. Sendur A.: Zawartość magnezu w twardych tkankach zębów. *Czas. Stomatol.* 1998, 51, 785–790.
15. Grobler S.R., Louw A.J., Rossouw R.J.: Surface enamel fluoride concentrations of different types of human teeth in a high- and near-optimal-fluoride area. *J. Dent. Res.* 1986, 65, 945–947.
16. Grobler S.R., Louw A.J.: Enamel-fluoride levels in deciduous and permanent teeth of children in high, medium and low fluoride areas. *Arch. Oral Biol.* 1986, 31, 423–426.
17. Mellberg J.R., Charig A., Deutchman M., O'Brien W., Lass A.: Effects of two fluoride gels on fluoride uptake and phosphorus loss during artificial caries formation. *J. Dent. Res.* 1986, 65, 1084–1086.
18. Informacja o stanie środowiska woj. szczecińskiego, PIOŚ. Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska w Szczecinie, Szczecin 1993.
19. Raport o stanie środowiska w woj. szczecińskim. Państwowa Inspekcja Ochrony Środowiska. Biblioteka Monitoringu Środowiska, Szczecin 1995.
20. Raport o stanie środowiska w woj. zachodniopomorskim w latach 1997–1998. Państwowa Inspekcja Ochrony Środowiska. Biblioteka Monitoringu Środowiska, Szczecin 1999.

21. *Buczowska-Radlińska J.*: Czynniki modyfikujące procesy de- i remineralizacji szkliwa zębów w aspekcie podatności na próchnicę zębów. *Ann. Acad. Med. Stetin.* 1999, Suppl. 47.
22. *Grobler S.R., van Zyl J.F., Stander I., Kotze T.J.*: Alkali-soluble and insoluble fluoride in erupted and unerupted human enamel from a high fluoride area with a low fluorosis score. *Arch. Oral Biol.* 1994, 39, 679–684.
23. *Knychalska-Karwan Z., Pawlicki R., Prostań-Kosowska K., Karwan T.*: Gospodarka wapniowo-fosforowo-magnezowa w zębach mlecznych dzieci mieszkających w strefie skażenia związkami fluoru. *Czas. Stomatol.* 1984, 37, 319–327.
24. *Nasir H.I., Retief D.H., Jamison H.C.*: Relationship between fluoride concentration and dental caries in a selected population. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 1985, 13, 65–67.
25. *Retief D.H., Harris B.E., Bradley E.L.*: Relationship between enamel fluoride concentration and dental caries experience. *Caries Res.* 1987, 21, 68–78.

EWA GRUCKA-MAMCZAR, DARIUSZ CHLUBEK¹, EWA BIRKNER, JOLANTA ZALEJSKA-FIOLKA,
IWONA BŁASZCZYK, SŁAWOMIR KASPERCZYK, BARBARA STAWIARSKA-PIĘTA²

WPLYW KOFEINY I FLUORKU SODU NA STĘŻENIE FLUORKÓW W SUROWICY KRWI I ICH ZAWARTOŚĆ W ZĘBACH I KOŚCIACH SZCZURÓW

THE EFFECT OF CAFFEINE AND SODIUM FLUORIDE ON FLUORIDE CONCENTRATION IN SERUM AND ITS CONTENT IN TEETH AND BONES OF RATS

Zakład Biochemii Ogólnej, Katedra Biochemii Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach
ul. Jordana 19, 41-808 Zabrze

Kierownik: dr hab. n. med. *Ewa Birkner*

¹Zakład Biochemii, Katedra Biochemii i Chemii Medycznej Pomorskiej Akademii Medycznej
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin

Kierownik: prof. dr hab. n. med. *Dariusz Chlubek*

²Katedra i Zakład Patologii, Wydział Farmaceutyczny Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach
ul. Ostrogórska 30, 41-200 Sosnowiec

Kierownik: prof. dr hab. n. med. *Ewa Szaflarska-Stojko*

Summary

Purpose: The aim of this work was to determine the effect of sodium fluoride at a dose of 4.9 mg/kg b.w./24 h and caffeine at a dose of 3 mg/kg b.w./24 h on the concentration of fluoride in serum and its content in teeth and bones of rats.

Material and methods: The study was done in 18 male Sprague–Dawley rats.

Conclusions: A negative effect of caffeine administered concurrently with sodium fluoride on teeth and bones of rats was demonstrated as reflected by a tendency to increased content of fluoride in bones and decreased content in teeth.

K e y w o r d s: fluoride – caffeine – serum – teeth – bones – rats.

Streszczenie

Wstęp: Celem pracy było zbadanie wpływu fluorku sodu w dawce 4,9 mg/kg m.c./dobę i kofeiny w dawce 3 mg/kg m.c./dobę na stężenie fluorków w surowicy krwi i ich zawartość w zębach i kościach szczurów.

Material i metody: Badania przeprowadzono na 18 samcach rasy Sprague–Dawley.

Wnioski: Wykazano niekorzystny wpływ kofeiny podawanej łącznie z fluorkiem sodu na kości i zęby badanych zwierząt, wyrażający się tendencją do nasilania kumulacji fluorków w kościach i zmniejszania ich zawartości w zębach.

H a s ł a: fluorki – kofeina – surowica – zęby – kości – szczury.

Wstęp

U ludzi i zwierząt laboratoryjnych ok. 99% całkowitej puli fluoru ulega zdeponowaniu w tkankach twardych: kościach i zębach. Pozostała część występuje w osoczu i tkankach miękkich.

Zawartość fluorków w kościach, będąca odzwierciedleniem indywidualnej ekspozycji na fluorki, jest zmienna i zależna od wieku, płci i typu kości [1]. Występuje także zróżnicowanie związane z niejednorodną strukturą samej kości (kość zbita i beleczkowa). Zwiększone wchłanianie fluorków przez dłuższy czas (ekspozycja przewlekła) może

prowadzić do fluorozy szkieletu, tj. patologicznego formowania kości. Jej początki bywają bezobjawowe i mogą być wykrywane jedynie w badaniach radiologicznych, jako zwiększenie gęstości kości, najczęściej kręgosłupa i miednicy. Badania bioptatów tkanki kostnej ujawniły zmiany histopatologiczne już poniżej 2 g F/kg kości. Zmiany takie, związane z relatywnie niskimi zawartościami fluorków w kościach, mogą być spowodowane długotrwałą ekspozycją na związki fluoru [2].

Innym przejawem toksycznego działania fluorków na ludzi i zwierzęta jest fluorozę zębowa [3]. Obserwowane w tym przypadku zmiany na powierzchni szkliwa występują częściej w wyniku długotrwałej ekspozycji na fluor. Istnieje kilka koncepcji na temat przyczyn powstawania fluorozy uzębienia. Jedną z nich mówi o uszkodzeniu przez fluorki komórek szkliwotwórczych (ameloblastów), inna o opóźnieniu kształtowania się szkliwa, jego mineralizacji i zakłóceniu wzrostu kryształów. Poza tym, uszkodzeniu ulegać może mechanizm regulujący równowagę wapniową [2].

Dotychczas ukazały się liczne publikacje dotyczące badań zawartości fluorków w kościach i zębach w warunkach narażenia na związki fluoru. Wiadomo jednak, iż ekspozycja izolowana, łatwa do przeprowadzenia w warunkach eksperymentalnych, ma miejsce rzadko w warunkach narażenia środowiskowego. Dlatego niezmiernie ważnym nurtem badań nad wpływem fluoru na funkcjonowanie organizmów jest poszukiwanie ewentualnych interakcji z innymi substancjami. Mogą one bowiem zarówno zwiększać (synergizm), jak i zmniejszać (antagonizm) efekty oddziaływania fluoru, co oczywiście nie pozostaje bez konsekwencji, tak korzystnych, jak i niekorzystnych.

Celem badań było zbadanie wpływu kofeiny, istotnego składnika diety, podawanej szczurom w wodzie pitnej jednocześnie z roztworem fluorku sodu, na stężenie fluorków w surowicy krwi i ich zawartość w zębach i kościach.

Material i metody

Badania przeprowadzono na 18 szczurach, 4,5-miesięcznych samcach rasy Sprague–Dawley, pochodzących z Centralnej Zwierzętarńi Doświadczalnej Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach. Zwierzęta podzielono na 3 równe grupy. Podczas eksperymentu miały one swobodny dostęp do standardowej paszy i wody. Zachowano im naturalny cykl dzieńno-nocny.

Szczury w grupie I (kontrolnej) spożywały wodę destylowaną. Grupa II otrzymywała w wodzie pitnej fluorek sodu w dawce 4,9 mg F/kg m.c./dobę. Grupa III pojoła wodą z taką samą dawką fluorków oraz 3 mg kofeiny/kg m.c./dobę. Doświadczenie kontynuowano przez 50 dni. Następnie zwierzęta usypiano tiopentalem w dawce 30 mg/szczura. W celu przeprowadzenia pomiarów pobierano krew, kości udowe i siekacze. W badanym materiale oznaczano zawartość fluorków metodą potencjometryczną, przy użyciu

jonoselektywnej elektrody fluorkowej Orion 96-09 (USA). Wyniki badań wyrażono w postaci średnich arytmetycznych i odchyłeń standardowych. W celu porównania różnic pomiędzy grupami zastosowano test U Manna–Whitneya. Za znamienne statystycznie przyjęto różnice na poziomie $p < 0,05$. Analizę statystyczną przeprowadzono przy wykorzystaniu programu Statistica PL.

Wyniki

Wyniki badań przedstawiono w tabelach 1–3.

Stężenie fluorków w surowicy zwierząt pojoanych wodą z NaF lub NaF i kofeiną było 1,5 razy większe ($p < 0,004$) w porównaniu z kontrolą (tab. 1). Nie stwierdzono znamienych różnic pomiędzy obiema grupami badanymi.

Tabela 1. Stężenie fluorków w surowicy krwi szczurów

Table 1. Fluoride concentrations in rat serum

Grupa Group	Stężenie fluorków (ppm) Fluoride concentration (ppm)		
	Średnia arytmetyczna Arithmetic mean	Odchylenie standardowe Standard deviation	Znamienność różnicy w stosunku do kontroli Significance of difference vs control
I	0,14	± 0,02	–
II	0,21	± 0,04	$p < 0,004$
III	0,21	± 0,03	$p < 0,004$

Zawartość fluorków w zębach szczurów grupy II wzrosła 9 razy ($p < 0,004$), a w grupie III 8,4 razy ($p < 0,004$) w stosunku do kontroli (tab. 2). Także w tym przypadku różnice pomiędzy grupami badanymi nie wykazały znamienności statystycznej.

Tabela 2. Zawartość fluorków w zębach szczurów

Table 2. Fluoride content in rat teeth

Grupa Group	Zawartość fluorków (ppm) Fluoride content (ppm)		
	Średnia arytmetyczna Arithmetic mean	Odchylenie standardowe Standard deviation	Znamienność różnicy w stosunku do kontroli Significance of difference vs control
I	115,3	± 18,34	–
II	1043,5	± 136,58	$p < 0,004$
III	970,4	± 130,99	$p < 0,004$

Zawartość fluorków w kościach szczurów z grupy otrzymującej wyłącznie NaF wzrosła 5,4 razy w stosunku do kontroli ($p < 0,004$). Identyczną znamienność statystyczną różnicy zawartości fluorków w kościach wykazano pomiędzy grupą otrzymującą łącznie NaF i kofeiną a grupą

kontrolną (wzrost 5,6 razy). Obie grupy badane (II i III) nie różniły się między sobą istotnie (tab. 3).

Tabela 3. Zawartość fluorków w kościach szczurów

Table 3. Fluoride content in rat bones

Grupa Group	Zawartość fluorków (ppm) Fluoride content (ppm)		
	Średnia arytmetyczna Arithmetic mean	Odchylenie standardowe Standard deviation	Znamiennosc różnicy w stosunku do kontroli Significance of difference vs control
I	184,3	± 22,20	–
II	995,3	± 96,18	p < 0,004
III	1032,2	± 119,79	p < 0,004

Dyskusja

W 1994 r. *Chen i Whitford* wykazali, iż kofeina zwiększa stężenie jonów fluorkowych w osoczu krwi szczurów [4]. Badania własne nie potwierdziły tej obserwacji, bowiem grupy eksponowane wyłącznie na fluorki lub na fluorki i kofeinę jednocześnie charakteryzowały się identycznymi stężeniami F⁻ w surowicy. W związku z tym, iż kofeina ma właściwości moczopędne, należałoby się spodziewać raczej spadku stężenia fluorków w surowicy niż jego wzrostu. Jednak ze względu na to, iż eksperyment trwał 50 dni mogły się w tym czasie wytworzyć mechanizmy, które ustabilizowały poziom fluorków w krążeniu badanych zwierząt. Jednym z nich była niewątpliwie inkorporacja jonów fluorkowych do struktur tkanek twardych i znaczny wzrost ich zawartości, odnotowany zarówno w zębach (tab. 2), jak i kościach (tab. 3). Należy przy tym pamiętać, iż jakkolwiek fluorki pobierane z krwi ulegają znaczącej kumulacji w tkankach twardych, to jednak nie wyklucza to ich uwalniania do osocza, zwłaszcza ze struktur kostnych. W warunkach ekspozycji przeważa oczywiście ten pierwszy proces, ale oba odpowiadają za stabilizację stężenia fluorków w osoczu.

Ilich i Kerstetter donoszą, iż takie składniki diety, jak białko, magnez, cynk, miedź, żelazo, fluorki czy witaminy D, A, C i K sprzyjają prawidłowemu metabolizmowi kości, podczas gdy inne, np. kofeina, alkohol i fitoestrogeny, zaburzają ten metabolizm [5]. Podobną opinię wyrażają *Miggiano i Gagliardi*, zalecając ograniczenie spożywania etanolu i kofeiny [6].

Chen i Whitford, w badaniach nad wpływem kofeiny na metabolizm fluorków, wapnia i fosforu u szczurów, wykazali jego brak w odniesieniu do wielkości diurezy i homeostazy fluorków w szkliwie [7]. Jedynie przy zastosowaniu największej dawki kofeiny (100 mg/kg m.c./dobę) odnotowano jej destrukcyjne działanie na kości. Wiadomo od dawna, iż ekspozycja na zbyt wysokie dawki fluorków wywołuje wzrost ich zawartości w kościach i zębach [3, 8, 9, 10, 11].

Dlatego przyjmowanie dużych ilości kofeiny w warunkach nadmiernej podaży fluorków może potęgować efekt ich kumulacji i sprzyjać rozwojowi fluorozoy.

W badaniach własnych zastosowano optymalne dawki kofeiny, które dla ludzi mieszczą się w granicach 3–6 mg/kg m.c./dobę [12]. Zapewne dlatego nie zaobserwowano znamionnego efektu potencjalizacji działania kofeiny wobec fluorków w badanych tkankach twardych. Dało się jednak zauważyć pewną tendencję do obniżania zawartości fluorków w zębach i ich podwyższania w kościach w grupie zwierząt otrzymujących kofeinę i fluorki łącznie (tab. 2 i 3). Obserwacja ta wydaje się potwierdzać wyniki badań innych autorów, którzy zwrócili uwagę na niekorzystny wpływ kofeiny mającej sprzyjać wzbogacaniu we fluorki struktur kostnych kosztem ich zawartości w uzębieniu [5, 6]. Oba kierunki działania są niekorzystne. Jony fluorkowe, które docierają do tkanki kostnej podstawiają grupy hydroksylowe w strukturze hydroksyapatytów. Powstały w ten sposób fluorohydroksyapatyt, a tym bardziej fluoroapatyt charakteryzuje się zmniejszoną aktywnością metaboliczną [13]. Stąd ewentualne nasilenie tego procesu przez kofeinę może skutkować pogłębionymi zaburzeniami metabolizmu kości. Z drugiej strony, dojrzewanie szkliwa i jego mineralizacja zależy od prawidłowego bilansu magnezowo-fluorkowego i oddziaływania obu pierwiastków na aktywność fosfataz zasadowych, katalizujących z kolei reakcje powstawania prawidłowych kryształów hydroksyapatytów [14]. Nie można wykluczyć, iż poprzez obniżanie zawartości fluorków kofeina zaburza bilans magnezowo-fluorkowy w szkliwie. Wykazywałaby wtedy jednoznacznie destrukcyjne działanie w odniesieniu do tej tkanki.

Kofeina jest nie tylko składnikiem tak popularnych i powszechnie używanych napojów jak kawa, herbata czy coca-cola. Występuje także w istotnych ilościach w modnych obecnie płynach energetyzujących. W tej sytuacji celowe jest zwrócenie uwagi na jej niekorzystne oddziaływanie wobec tkanek twardych, odpowiedzialnych w dużej mierze za jakość naszego życia.

Wnioski

1. Kofeina nie wywiera wpływu na stężenie fluorków w surowicy krwi szczurów eksponowanych na fluorek sodu w wodzie pitnej.
2. Kofeina sprzyja wzbogacaniu kości we fluorki przy jednoczesnym ograniczaniu ich kumulacji w tkankach zęba szczurów.
3. Wobec wpływu kofeiny na tkanki twarde, celowym wydaje się ograniczanie jej spożycia.

Piśmiennictwo

1. Environmental Health Criteria 227. Fluorides. World Health Organization, Geneva 2002.

2. *Indulski J.A.*: Kryteria zdrowotne środowiska. Fluor i fluorki. PZWL, Warszawa 1989.
3. *Grucka-Mamczar E., Machoy Z., Tarnawski R., Birkner E., Polaniak R., Mamczar A.*: Wpływ jonu fluorkowego podawanego z wodą pitną na zawartość fluorków, magnezu i wapnia w zębach szczurów. *Czas. Stomatol.* 1998, 51, 427–432.
4. *Chen X., Whitford G.M.*: Lack of significant effect of coffee and caffeine on fluoride metabolism in rats. *J. Dent. Res.* 1994, 73, 1173–1179.
5. *Ilich J.Z., Kerstetter J.E.*: Nutrition in bone health revisited: a story beyond calcium. *J. Am. Coll. Nutr.* 2000, 19, 715–737.
6. *Miggiano G.A., Gagliardi L.*: Diet, nutrition and bone health. *Clin. Ther.* 2005, 156, 47–56.
7. *Chen X., Whitford G.M.*: Effect of caffeine on fluoride, calcium and phosphorus metabolism and calcified tissues in the rat. *Arch. Oral Biol.* 1999, 44, 33–39.
8. *Bohatyrewicz A., Ogoński T., Dąbkowska E., Machoy Z.*: Skład mineralny tkanki kostnej blaszkowatej i zbitej u pacjentek ze złamaniem szyjki kości udowej na tle osteoporozy. *Met. Fluoru*, 1998, 8, 70–74.
9. *Caishuang L., Yubin T., Xueping L., Jiyuan F.*: A study of equilibrium between ionic fluoride and nonionic fluoride in serum of monkeys with skeletal fluorosis. *Fluoride*, 1989, 22, 150–154.
10. *Caishuang L., Xiaodong K.*: Ionic, nonionic and total fluoride in human serum. *Fluoride*, 1990, 23, 164–170.
11. *Szczepańska J.*: Analiza pierwiastków wchodzących w skład zębiny zębów mlecznych w badaniach in vitro po zastosowaniu preparatów remineralizujących zawierających fluorek sodu i ksylitol. *Doniesienie wstępne. Czas. Stomatol.* 2000, 53, 11–15.
12. *Magkos F., Kavouras S.A.*: Caffeine and ephedrine. Physiological, metabolic and performance-enhancing effects. *Sports Med.* 2004, 34, 871–889.
13. *Czerwiński E.*: Ilościowa ocena zmian występujących pod wpływem fluoru w kości korowej i gąbczastej oraz ich znaczenie diagnostyczne. [Maszynopis powielany] CMUI, Kraków 1994.
14. *Dąbkowska E., Chlubek D., Machaliński B., Machoy Z., Mokrzyński S.*: Zawartość fluorków w zębach łosia europejskiego. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1995, 27, 129–132.

MARIA JEZERSKA-MADZIAR, PIOTR PIŃSKWAR¹, JANUSZ GOLSKI

KUMULACJA FLUORU W MATACH GLONÓW NITKOWATYCH (*CHLOROPHYTA*) Z EKOSYSTEMU WODNEGO O PODWYŻSZONEJ KONCENTRACJI FLUORKÓW

ACCUMULATION OF FLUORINE BY FILIFORM ALGAE (*CHLOROPHYTA*) AGGLOMERATIONS IN AN AQUEOUS ECOSYSTEM WITH INCREASED FLUORIDE CONTENT

Katedra Rybactwa Śródlądowego i Akwakultury Akademii Rolniczej w Poznaniu
ul. Woj. Polskiego 71c, 60-625 Poznań
Kierownik: prof. dr hab. Antoni Przybył

¹ Zakład Badań Środowiska Rolniczego i Leśnego Polskiej Akademii Nauk
ul. Bukowska 19, 50-809 Poznań
Kierownik: prof. dr hab. Andrzej Kędziora

Summary

Purpose: Studies were carried out in 1995–2005 in the Warta oxbow lake at Luboń on the accumulation of fluorine by abiotic and biotic elements of this water ecosystem.

Material: The reservoir had been polluted for several decades with fluorine compounds as by-products from a plant producing phosphate fertilizers. We present the results on the accumulation of fluorine by filiform algae (*Chlorophyta*) agglomerations. Fluorine content ranged on the average from 433 to 608 mgF/kg dry mass.

Result: Studies carried out so far demonstrate that the greatest amount of fluorine accumulated in phytoplankton.

K e y w o r d s: Warta oxbow lake – filiform alge (*Chlorophyta*) – fluorine accumulation.

Streszczenie

Wstęp: W latach 1995–2005 w starorzeczu w Luboniu prowadzono badania nad kumulacją fluoru w abiotycznych i biotycznych elementach tego ekosystemu wodnego.

Material: Badany zbiornik od kilkudziesięciu lat zanieczyszczany jest związkami fluoru, jako substancjami ubocznymi z produkcji nawozów fosforowych. Praca przedstawia wyniki badań nad kumulacją fluoru w matach glonów

nitkowatych. Zawartość fluoru wahała się średnio od 433 do 608 mgF/kg suchej masy.

Wynik: Jak wynika z dotychczasowych badań największa ilość fluoru skumulowana została w fitoplanktonie.

H a s ł a: starorzecze – zielenice nitkowate – kumulacja fluoru.

Wstęp

Gwałtowny rozwój przemysłu w XX wieku spowodował, że stężenie fluoru w naturalnym środowisku znacznie przekroczyło jego naturalną koncentrację. Szczególnie narażone są obszary położone blisko zakładów emitujących związki fluoru, z takich gałęzi przemysłu jak: huty aluminium, huty metali kolorowych i żelaza, fabryki nawozów fosforowych i wyrobów ceramicznych.

Bioindykatorem kumulacji fluoru w poszczególnych elementach łańcucha troficznego są jednym z ważnych parametrów obrazujących zmiany biogeochemiczne zachodzące w środowisku przyrodniczym. Fluor poprzez swoją wysoką aktywność chemiczną może stanowić zagrożenie dla bioceoz zarówno ekosystemów lądowych, jak i wodnych.

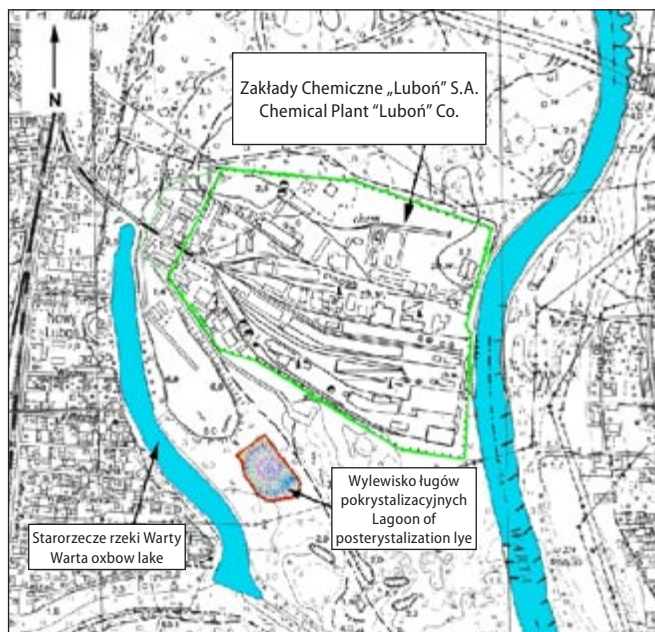
W Akademii Rolniczej w Poznaniu prowadzone są od dziesięciu lat badania w starorzeczu rzeki Warty, które podlega od dłuższego czasu wpływowi Zakładów Chemicznych w Luboniu, produkujących nawozy fosforowe. Dotychczasowo

we badania wykazały znacznie podwyższone stężenia fluoru w wodzie i osadach dennych starorzecza [1, 2, 3]. Badany zbiornik stał się studium eksperymentalnym, w którym prześledzono zawartość fluoru nie tylko w abiotycznych elementach tego ekosystemu, ale także w roślinności oraz w rybach [4, 5].

Celem prezentowanych w pracy badań było określenie kumulacji fluoru w matach glonów nitkowatych, rozwijających się masowo w poszczególnych częściach zbiornika.

Material i metody

Starorzecze Warty w Luboniu jest zbiornikiem nieprzepływowym, a połączenie z rzeką następuje tylko wtedy, gdy wystąpi w niej wielka woda, co zdarza się raz na kilkadziesiąt lat. Dlatego też zgodnie z nomenklaturą hydrologiczną należy zaliczyć ten zbiornik do tzw. jezior rzecznych [6]. Szczegółową charakterystykę morfometryczno-hydrologiczną zbiornika przedstawiono we wcześniejszych publikacjach [1, 2]. Starorzecze ma kształt wydłużony (dł. maks. 900 m, szer. maks. 120 m), o głębokości średniej 2,5 m i kubaturze 150 000 m³ (ryc. 1).



Ryc. 1. Usytuowanie starorzecza rzeki Warty w Luboniu

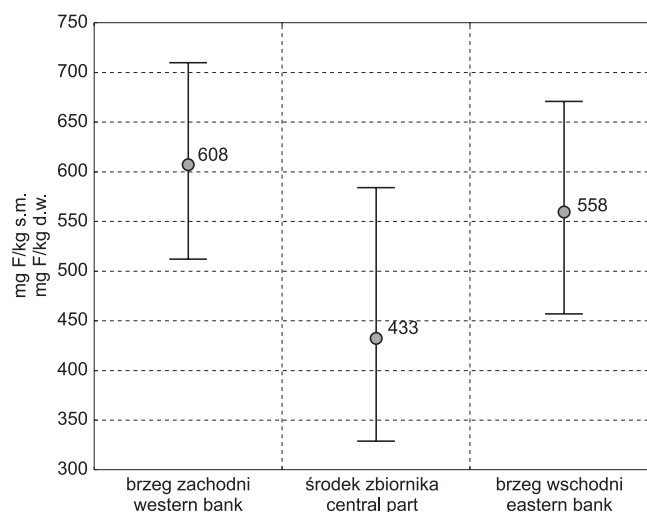
Fig. 1. Location of the Warta oxbow lake at Luboń

Próby glonów nitkowatych pobierano wzdłuż zachodniego i wschodniego brzegu oraz ze środkowej części zbiornika, następnie przewożono do laboratorium i suszono na powietrzu oraz równolegle w suszarce do absolutnie suchej masy w 105°C. Z każdej próbki pobierano 10 g powietrznie suchego materiału biologicznego, który homogenizowano i mineralizowano z dodatkiem CaO w piecu muflowym, zgodnie z metodą *Halla* [7]. Spopieleny materiał przenoszono ilościowo do kolby destylacyjnej i w obecności 57% H₂SO₄ i Ag₂SO₄ poddawano wielokrotnej destylacji z parą wodną. Zawartość fluorków mierzono potencjometrycznie

przy zastosowaniu fluorkowej elektrody jonoselektywnej na aparacie Orion 720.

Dyskusja i wyniki

Uzyskane wyniki badań przedstawiono na rycinie 2. Najmniejszą kumulację fluoru zanotowano w matach glonów nitkowatych pobranych ze środkowej części, a najwyższą – z zachodniego brzegu zbiornika. Maty glonów nitkowatych w całym okresie badawczym kumulowały w zbiorniku od 329 mgF/kg do 710 mgF/kg w przeliczeniu na suchą masę materiału biologicznego.



Ryc. 2. Zawartość fluoru w matach glonów nitkowatych (*Chlorophyta*) w starorzeczu Warty w Luboniu w mg F/kg s.m.

Fig. 2. Fluorine content in filiform algae (*Chlorophyta*) agglomerations (mg F/kg d.w.) in the Warta oxbow lake at Luboń

W literaturze światowej brak szczegółowych badań nad kumulacją fluoru w roślinności i planktonie przy tak wysokich stężeniach fluorków w wodzie. Zawartość fluorków w starorzeczu w latach 1978–1984 wahała się od 16,7 do 75,0 mgF/L [8, 9]. Prowadzone od 1995 r. systematyczne badania wykazały, że stężenie fluorków w wodzie wzrasta w okresie letnim nawet do wartości powyżej 6 mgF/L [10]. Jak wynika z dotychczasowych badań, najwyższą kumulację fluoru stwierdzono w fitoplanktonie – średnio 2263 mgF/kg s.m., natomiast w hydromakrofitach od 778 do 1166 mgF/kg s.m. [4].

Piśmiennictwo

1. Jezierska-Madziar M., Przybył A., Pińskwar P., Andrzejewski W.: Możliwości wykorzystania starorzecza rzeki Warty w Luboniu dla celów rybackich. I. Ocena jakości wody w starorzeczu ze szczególnym uwzględnieniem związków fluorków. Roczn. AR Pozn., 1997, 299, Zootech. 49, 35–48.
2. Jezierska-Madziar M., Pińskwar P., Przybył A.: Reduction in fluoride levels in old Warta reservoirs near Luboń, Poland. *Fluoride*, 2001, 34, 1, 51–54.
3. Jezierska-Madziar M., Pińskwar P., Golski J.: Fluorine content of bottom sediments in old Warta reservoir near Luboń, Poland. *Fluoride*, 2006, 39, 1, 39–42.

4. *Jezierska-Madziar M., Pińskwar P.*: Fluoride in common reeds (*Phragmites australis*) sampled from the old Warta reservoirs near Luboń and Radzewice, Poland. *Fluoride*, 36, 21–24.
5. *Pińskwar P., Jezierska-Madziar M., Golski J.*: Fluoride in bone tissue of fish sampled from the old reservoirs near Luboń and Radzewice, Poland. *Fluoride*, 2003, 36, 3, 185–188.
6. *Bajkiewicz-Grabowska E., Mikulski Z.*: *Hydrologia ogólna*. PWN, Warszawa 1996.
7. *Hall J.R.*: Observation on the distribution and determination of fluorine compounds in biological materials including soils. *Analyst*, 1968, 93, 461–468.
8. *Zbierska J.*: Zawartość fluoru w wodach powierzchniowych i gruntowych w rejonie zakładów nawozów fosforowych. *Rocz. AR Pozn.* 1981, 133, 89–98.
9. *Zbierska J.*: Wpływ emisji zanieczyszczeń z zakładów nawozów fosforowych na zawartość fluoru w wodach powierzchniowych i gruntowych. *Pr. Kom. Nauk Roln. Nauk Leśn. PTPN*, 1986, 61, 287–295.
10. *Jezierska-Madziar M., Pińskwar P., Golski J.*: Sezonowe zmiany zawartości fluorków w wodzie starorzecza Warty w Luboniu. *Ann. Acad. Med. Stetin.* 2004, 50, 54–57.

URSZULA KACZMAREK, BEATA PREGIEL, ALINA WRZYSZCZ-KOWALCZYK,
IWONA GRZESIAK, KATARZYNA FITA

POZIOM FLUORU W ŚLINIE PO SZCZOTKOWANIU ZĘBÓW PASTAMI FLUORKOWYMI Z I BEZ PŁUKANIA WODĄ

FLUORIDE LEVELS IN SALIVA AFTER TOOTH-BRUSHING USING FLUORIDE TOOTHPASTES WITH AND WITHOUT RINSING OF ORAL CAVITY

Katedra i Zakład Stomatologii Zachowawczej i Dziecięcej Akademii Medycznej we Wrocławiu
ul. Krakowska 26, 50-425 Wrocław
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Urszula Kaczmarek

Summary

Purpose: The aim of the study was to determine salivary fluoride concentrations after tooth-brushing with fluoride toothpastes with and without rinsing of oral cavity.

Material and methods: Fluoride levels in the supernatant of unstimulated mixed saliva were measured after tooth-brushing with Elmex (amine fluoride, 0.125% F) and Meridol (amine fluoride, stannous(II) fluoride, 0.14% F) toothpaste with and without rinsing. Fluoride concentration was measured using a fluoride ion-specific electrode (Orion 96 09BN) connected to a CPI-551 computer. The study was done in 120 subjects from whom salivary samples were taken before and after 15 and 30 min. from tooth-brushing with and without rinsing.

Results: Fluoride levels in saliva correlated with time from tooth-brushing and with oral cavity rinsing. Tooth-brushing with rinsing led to similar increase/decrease in fluoride level in saliva for both toothpastes. The use of toothpaste without rinsing vs rinsing produced a two-fold increase in the level of salivary fluoride in the case of Elmex and a three-fold increase in the case of Meridol toothpaste. Fluoride content in saliva 30 minutes after brushing was higher than baseline.

Conclusion: Significantly higher fluoride levels in saliva after tooth-brushing with fluoride toothpastes were noted when tooth-brushing was not followed by oral cavity rinsing.

K e y w o r d s: fluoride toothpaste – tooth-brushing – fluoride – saliva.

Streszczenie

Wstęp: Celem pracy było porównanie stężenia fluoru w ślinie po szczotkowaniu zębów pastami fluorkowymi z płukaniem i bez płukania jamy ustnej wodą.

Material i metody: Oceniono poziom fluoru w supernatancie niestymulowanej śliny mieszanej po szczotkowaniu zębów pastami Elmex (aminofluorek, 0,125% F) i Meridol (aminofluorek, fluorek cyny(II), 0,14% F) z płukaniem i bez płukania jamy ustnej wodą. Stężenie fluoru oznaczano za pomocą jonoselektywnej elektrody (Orion 96 09BN) połączonej z mikrokomputerem CPI-551. Badaniem objęto 120 osób, u których próbki śliny pobierano trzykrotnie (przed oraz po upływie 15 i 30 minut od szczotkowania zębów daną pastą z następowym płukaniem jamy ustnej wodą lub bez płukania).

Wyniki: Wykazano istotny statystycznie związek między poziomem fluoru w ślinie a upływem czasu od szczotkowania zębów oraz płukaniem jamy ustnej. Szczotkowanie zębów z płukaniem obydwoma pastami powodowało podobne wzrosty/spadki poziomu fluoru w ślinie w poszczególnych pomiarach. Natomiast użycie pasty bez płukania, w odniesieniu do płukania jamy ustnej wodą, powodowało w przypadku pasty Elmex około dwukrotny, a w przypadku pasty Meridol około trzykrotny wzrost stężenia fluoru w ślinie. Po upływie 30 minut od szczotkowania stężenie fluoru w ślinie przewyższało poziom stężenia wyjściowego.

Wniosek: Istotnie wyższe poziomy fluoru w ślinie występują po szczotkowaniu zębów pastą fluorkową bez płukania jamy ustnej wodą.

H a s ł a: fluorkowe pasty do zębów – szczotkowanie zębów – fluorki – ślina.

Wstęp

Ochronną rolę fluoru wobec próchnicy zębów, będącej chorobą społeczną, odkryto w latach 30. XX wieku w związku z naturalną zawartością fluoru w wodzie pitnej [1, 2]. Od tego czasu rozpoczęto badania nad efektywnością kariostaticznego oddziaływania fluoru dostarczanego do organizmu systemowo za pośrednictwem sztucznie fluorkowanej wody, tabletek/kropli, mleka lub soli albo miejscowo poprzez fluorkowane pasty do zębów, płukanki, roztwory, żele, lakiery, nici dentystyczne, wykałaczki oraz materiały do wypełnień, uwalniające jony fluorkowe. Znaczącą rolę w występującej w wielu krajach redukcji choroby próchnicowej przypisuje się powszechnie i systematycznie stosowanym pastom do zębów zawierającym fluorki. Stosowanie ich jest najprostszą formą kontroli próchnicy u osób w każdym wieku i zapewnia łączny efekt ułatwiania mechanicznego usuwania próchnicotwórczej płytki nazębnej z dostarczaniem fluorków do interfazy ślina/płytkatwarda tkanka zęba. Efektywność działania past fluorkowych jest dobrze udokumentowana [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11]. W środowisku jamy ustnej jony fluorkowe kontrolują rozwój próchnicy poprzez trzy mechanizmy: hamowanie demineralizacji, wzmożenie remineralizacji oraz obniżanie wzrostu i metabolizmu bakterii próchnicotwórczych. Dostarczane do środowiska jamy ustnej poprzez pasty do zębów niskie stężenia jonów fluorkowych wywierają działanie za pośrednictwem dwóch pierwszych mechanizmów. Ich działanie kariostatyczne wynika z retencji w płytce i ślinie powodującej modyfikację równowagi procesów demineralizacji i remineralizacji [12, 13]. Badacze sugerują, że w ślinie już stężenie fluoru powyżej wartości 0,03 ppm przyspiesza proces remineralizacji [14].

Do past dodawane są związki fluoru nieorganiczne (fluorek sodu – NaF, fluorek cyny(II) – SnF₂, monofluorofosforan sodu – Na₂PO₄F) i organiczne (aminofluorki). Według zaleceń Komisji Europejskiej z 1977 r. [3] zawartość fluoru w pastach do zębów do codziennego użytku nie powinna przekraczać 1500 ppm. Dodawany do pasty fluorek sodu łatwo ulega dysocjacji i powstaje aktywna, zjonizowana postać fluoru (F⁻). Natomiast związany kowalencyjnie w cząsteczce monofluorofosforanu sodu jon fluorkowy uwalniany jest w wyniku hydrolizy przez bakteryjną niespecyficzną fosfatazę, co następuje przy kontakcie z płynami jamy ustnej, przed dyfuzją do płytki. Fluorek cyny(II), oprócz uwalniania jonów fluorkowych, działa dodatkowo bakteriostatycznie ze względu na jony cyny, ale przebarwiają one zęby w wyniku tworzenia tlenku tego metalu oraz powodują odczucie ściągania tkanek miękkich [12, 15]. Aminofluorki łączą działanie przeciwpróchnicowe fluoru z surfaktacyjnymi właściwościami długich łańcuchów alifatycznych amin i tworząc rezerwuar fluoru na szkle ułatwiają jego wnikanie. Wykazują także działanie antibakteryjne [16].

W wielu badaniach oceniano retencję fluoru w jamie ustnej po miejscowym zastosowaniu preparatów fluorkowych (pasty, żele, płukanki). Wykazano związek między poziomem fluoru w jamie ustnej a jego zawartością w paście do zębów [17], a także wzrost stężenia w ślinie wraz ze wzrostem stężenia fluoru w preparacie [18]. Oceniając poziomy fluoru w wydzielinie z przewodów gruczołowych ślinianek, ślinie całkowitej i płytce, zauważono, że metoda i czas aplikacji oraz stężenie fluoru w preparacie znamienne wpływają na poziom fluoru w jamie ustnej [10].

Celem pracy było porównanie poziomu fluoru w ślinie po szczotkowaniu zębów wybranymi pastami fluorkowymi z płukaniem i bez płukania jamy ustnej wodą po oczyszczeniu.

Material i metody

Badania przeprowadzono u 120 osób, ochotników obojga płci, w wieku 21–35 lat, o podobnych nawykach higienicznych i żywieniowych. Szczotkowali oni zęby pod nadzorem dwiema pastami do zębów: Elmex (grupa 1, n = 60) i Meridol (grupa 2, n = 60) przez okres 1 minuty z użyciem pasma pasty długości 1 cm, a po zabiegu płukali jamę ustną 40 mL wody destylowanej (podgrupy 1a i 2a, liczące po 30 osób) lub nie płukali, a tylko wypluwali resztki pasty (podgrupy 1b i 2b po 30 osób). Źródłem fluoru w paście do zębów Elmex jest aminofluorek o nazwie handlowej olaflur – bis(hydroksyetylo)-aminopropilo-N-hydroksyetylo-oktadecylamino-dwuhydrofluorek sodu w ilości odpowiadającej 0,125% F (1250 ppm). Natomiast pasta Meridol, oprócz aminofluorku (olaflur), zawiera fluorek cyny(II) w ilościach odpowiadających 0,14% F (1400 ppm). Dane o zawartości fluorków w pastach pochodzą od producenta.

Niestymulowaną ślinę mieszaną (deponowanie śliny do probówki) pobierano trzykrotnie: przed szczotkowaniem – badanie 0, po upływie 15 min – badanie I i 30 min od szczotkowania – badanie II. Pacjenci w czasie trwania badania nie spożywali żadnych pokarmów ani napojów, a przed oceną byli proszeni o pozostanie na czczo i nie szczotkowanie zębów w domu. Pobrane próbki śliny mieszanej wirowano przez 15 min przy 3900 obr./min i w otrzymanym supernatancie oznaczano poziom fluoru za pomocą jonoselektywnej elektrody (Orion 9609 BN) połączonej z mikrokomputerem CPI-551. Ogółem oznaczenia fluoru wykonano w 460 próbkach śliny.

W analizie statystycznej danych zastosowano test Wilcoxon lub test par U Manna–Whitneya. Za istotne statystycznie przyjęto różnice na poziomie $p \leq 0,05$.

Wyniki

W analizie danych nie uwzględniano płci badanych, gdyż nie wykazano różnic w poziomie fluoru w ślinie pomiędzy kobietami i mężczyznami. Średni wyjściowy po-

Tabela 1. Poziom fluoru w ślinie po szczotkowaniu zębów badanymi pastami

Table 1. Level of fluoride in saliva following tooth-brushing

Parametry Parameters	Badanie 0 Measurement 0	Badanie I Measurement I	Badanie II Measurement II
	x ± SD	x ± SD	x ± SD
Grupa 1 / Group 1			
Podgrupa 1a Subgroup 1a	0,25 ± 0,15	0,59 ± 0,33	0,36 ± 0,19
Podgrupa 1b Subgroup 1b	0,26 ± 0,11	1,01 ± 0,46	0,48 ± 0,26
Grupa 2 / Group 2			
Podgrupa 2a Subgroup 2a	0,27 ± 0,11	0,58 ± 0,26	0,38 ± 0,15
Podgrupa 2b Subgroup 2b	0,19 ± 0,08	1,27 ± 0,65	0,50 ± 0,25

Istotność różnic / Statistical significance:

⌋ p < 0,05; ⌋ p < 0,01; ⌋ p < 0,001

Podgrupy 1a i 2a – płukanie jamy ustnej wodą po szczotkowaniu
Subgroup 1a and 2a – tooth-brushing with rinsing

Podgrupy 1b i 2b – brak płukania jamy ustnej wodą po szczotkowaniu
Subgroup 1b and 2b – tooth-brushing without rinsing

Tabela 2. Przyrosty/spadki stężenia fluoru w ślinie między pomiarami

Table 2. Increase/decrease in salivary fluoride concentration between measurements

Parametry Parameters	Badanie I vs 0 Measurement I vs 0	Badanie II vs I Measurement II vs I	Badanie II vs 0 Measurement II vs 0
	x ± SD	x ± SD	x ± SD
Grupa 1 / Group 1			
Podgrupa 1a Subgroup 1a	0,34 ± 0,22	0,23 ± 0,20	0,11 ± 0,11
Podgrupa 1b Subgroup 1b	0,75 ± 0,42	0,53 ± 0,33	0,22 ± 0,22
Grupa 2 / Group 2			
Podgrupa 2a Subgroup 2a	0,31 ± 0,19	0,11 ± 0,10	0,10 ± 0,10
Podgrupa 2b Subgroup 2b	1,08 ± 0,64	0,77 ± 0,53	0,31 ± 0,24

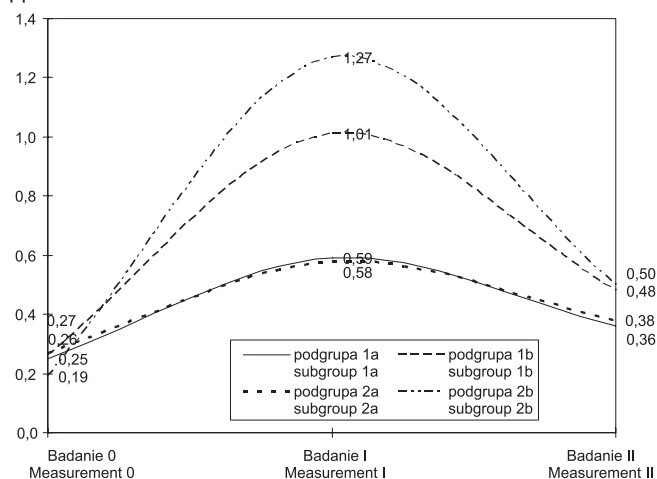
Istotność różnic / Statistical significance: ⌋ p < 0,05; ⌋ p < 0,01

Podgrupy 1a i 2a – płukanie jamy ustnej wodą po szczotkowaniu
Subgroup 1a and 2a – tooth-brushing with rinsing

Podgrupy 1b i 2b – brak płukania jamy ustnej wodą po szczotkowaniu
Subgroup 1b and 2b – tooth-brushing without rinsing

ziom fluoru w ślinie dla wszystkich grup badanych wahał się 0,19–0,27 ppm. Różnił się on istotnie (p < 0,05) tylko pomiędzy podgrupami grupy 2a i 2b, stosującymi pastę Meridol. W tabeli 1 i na rycinie 1 zestawiono dane uzyskane dla wszystkich podgrup badanych. Po upływie 15 min od szczotkowania zębów obydwoma pastami, niezależnie od płukania jamy ustnej, zanotowano istotny (p < 0,001) wzrost stężenia fluoru w ślinie w porównaniu z poziomem wyjściowym (badanie 0 vs I). Poziom ten po upływie dalszych 15 min ulegał znamienemu obniżeniu (p < 0,001), ale nadal przewyższał wartość wyjściową (badanie II vs 0). Po upływie 30 min od szczotkowania w podgrupie 1a po-

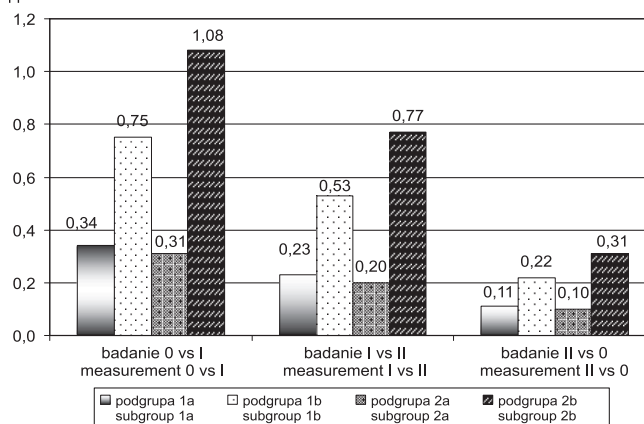
ppm F



Ryc. 1. Porównanie poziomu fluoru w ślinie po szczotkowaniu zębów pastami z płukaniem i bez płukania jamy ustnej wodą po szczotkowaniu

Fig. 1. Concentrations of fluorine in saliva after tooth-brushing with or without rinsing after tooth-brushing

ppm F



Ryc. 2. Średnie przyrosty/spadki stężenia fluoru w ślinie między kolejnymi pomiarami

Fig. 2. Mean increase/decrease in fluorine concentration in saliva between measurements

ziom fluoru w ślinie był wyższy od wyjściowego o 44%, w podgrupie 1b o 85%, w podgrupie 2a o 40%, a w podgrupie 2b o 163%.

Po szczotkowaniu zębów zarówno pastą Elmex, jak i Meridol z następowym płukaniem jamy ustnej wodą zauważono podobne przyrosty/spadki poziomu fluoru w ślinie. Wynosiły one w badaniu I vs 0 odpowiednio 0,34 ppm i 0,31 ppm, w badaniu II vs I – 0,23 ppm i 0,20 ppm, a w badaniu II vs 0 – 0,11 ppm i 0,10 ppm (tab. 2, ryc. 2). Natomiast przy braku płukania jamy ustnej po szczotkowaniu, wyższe przyrosty/spadki poziomu fluoru zaobserwowano po zastosowaniu pasty Meridol. Wartości te wynosiły odpowiednio w badaniu I vs 0 – 1,08 ppm i 0,75 ppm (różnica istotna na poziomie p < 0,01), w badaniu II vs I – 0,53 ppm i 0,77 ppm (różnica o 31%), a w badaniu II vs 0 – 0,22 ppm i 0,31 ppm (różnica o 29%). Szczotkowanie zębów obydwoma pastami bez płukania jamy ustnej powodowało istotny wzrost stężenia fluoru w ślinie w porównaniu z płukaniem jamy ustnej wodą po oczyszczeniu.

Dyskusja

Jak wynika z literatury, determinantą efektu przeciwo próchnicowego jest zawartość fluoru w paście i jego biodostępność, uwarunkowana powstawaniem w środowisku jamy ustnej jonu fluorkowego [2, 15]. Stwierdzono, że przy stężeniu w przedziale 1000–1500 ppm, na każdy wzrost stężenia o 500 ppm zwiększa się skuteczność pasty o 6%. W badaniu własnym zastosowanie past o zbliżonym stężeniu fluoru (Elmex – 0,125% F i Meridol – 0,14% F) spowodowało uzyskanie podobnych wzrostów/spadków poziomu fluoru w ślinie po upływie 15 i 30 min od szczotkowania zębów jednakową ilością pasty, przez taki sam okres czasu, z następowym płukaniem jamy ustnej wodą (tab. 2). Płukanie określoną ilością wody polecano badanym ze względu na powszechnie występujący nawyk płukania jamy ustnej wodą po szczotkowaniu.

Jak oczekiwano, poziomy fluoru w ślinie u osób nie płuczających jamy ustnej wodą po szczotkowaniu zębów pastą fluorkową były istotnie wyższe niż u płuczających. W przypadku użycia pasty Elmex zaobserwowano około dwukrotnie, a przy użyciu pasty Meridol około trzykrotnie wyższe przyrosty stężenia fluoru w ślinie między poszczególnymi okresami pomiarowymi (tab. 2). Wynika z tego, iż spośród parametrów charakteryzujących sposób oczyszczania zębów – ilość używanej pasty, czas kontaktu pasty z zębami podczas oczyszczania – istotny jest sposób zakończenia zabiegu (płukanie jamy ustnej wodą, wyplwanie pasty bez płukania). Wykazano także, iż ok. 22% użytej pasty jest zatrzymywane na szczotce [10]. Jamę ustną płucze się w sposób zróżnicowany – wodą z kubka lub naniesioną do garści ręki albo szczoteczką zwilżoną wodą. Stosowanie większej ilości wody (korzystanie z kubka) przyczynia się do usuwania znaczniejszych ilości fluorków z rezerwuarów jamy ustnej ze względu na gradient stężeń, co zmniejsza działanie kariostatyczne. Natomiast, gdy po zakończeniu szczotkowania do jamy ustnej, zawierającej mieszaninę nieusuniętej pasty fluorkowej ze śliną, wprowadza się niewielką ilość wody i przetrzymuje przez pewien czas, wówczas uzyskuje się efekt działania płukanki i zwiększenie redukcji próchnicy. *Duckworth i wsp.* [19] wykazali, że płukanie odgrywa istotną rolę w retencji fluoru w jamie ustnej, dostarczanego za pośrednictwem past do zębów, ale – jak wynika z badania *Sjogrena i Melina* [13] – czas trwania płukania nie wpływa istotnie na retencję fluoru w ślinie całkowitej i płytce. *Machiulskiene i wsp.* [20] w trzyletnim badaniu klinicznym nie zanotowali znamiennych różnic w przyroście próchnicy u dzieci płuczających i niepłuczających jamę ustną po szczotkowaniu zębów.

Wzrost stężenia fluoru w ślinie, obserwowany w danym okresie czasu po zastosowaniu preparatu fluorkowego, jest następstwem złożonej interakcji między czynnikami wpływającymi na usuwanie a czynnikami oddziałującymi na retencję fluoru. Usuwanie fluoru z jamy ustnej (*oral clearance*) przyspiesza płukanie jamy ustnej wodą po szczotkowaniu poprzez efekt rozcieńczenia. Sprzyja temu także wyplwanie pasty po zabiegu szczotkowania, jak również fizjologiczne

wydzielanie śliny i odruchowe jej polykanie lub spożywanie pokarmów płynnych oraz stałych [16, 21].

Z badań przeprowadzonych przez *Campusa i wsp.* [16] oraz *Issa i Tumba* [21] wynika szybkie (po upływie 30 min) zmniejszanie się stężenia fluoru po użyciu past do zębów. Sugeruje się dwufazowe obniżanie się poziomu fluoru do starczonego przy użyciu pasty – szybkie usuwanie w początkowej fazie trwającej 40–80 min i powolna eliminacja fluoru z rezerwuarów jamy ustnej (powierzchnie zębów, tkanki miękkie) w fazie drugiej, trwającej kilka godzin [17]. Natomiast dane własne, uzyskane zarówno w prezentowanym badaniu, jak i we wcześniej opublikowanych wynikach [22], wskazują na obniżanie się stężenia fluoru w ślinie już po upływie 15 min od szczotkowania zębów.

Poziom fluoru w ślinie jest indykatorem jego retencji w jamie ustnej. Jak dotąd nie w pełni rozstrzygnięto kwestię dotyczącą minimalnej ilości fluorków w ślinie, warunkującą przesunięcie równowagi z demineralizacji w kierunku remineralizacji. W aspekcie ochrony przed próchnicą takie stężenie powinno być utrzymane przez cały dzień, a zwłaszcza w okresie fermentacji węglowodanów w płytce. Przeprowadzone ostatnio badania przez *ten Cate i wsp.* [23] nad efektywnością fluorkowych past do zębów w warunkach cyklicznych zmian pH *in vitro*, symulujących przebiegające naprzemiennie procesy demineralizacji i remineralizacji *in vivo*, przyczyniają się do lepszego zrozumienia sposobu działania niskich stężeń fluoru. Autorzy wykazali, m.in. przy stężeniu fluoru wynoszącym 3 ppm, 70% redukcję utraty wapnia ze szkliwa podczas demineralizacji i wzrost wchłaniania wapnia podczas okresu remineralizacji oraz odwrotną korelację utraty substancji mineralnej ze stężeniem fluoru w środowisku. Uzyskane przez nich dane wskazują na działanie fluoru jako siły napędowej procesu remineralizacji.

W podsumowaniu można stwierdzić, iż uzyskane dane potwierdzają istotny statystycznie związek poziomu fluoru w ślinie z upływem czasu od szczotkowania zębów pastą fluorkową oraz z płukaniem jamy ustnej wodą po szczotkowaniu.

Piśmiennictwo

1. *Torrado A., Valiente M., Zhang W., Li Y., Munoz C.A.*: Remineralization potential of a new toothpaste formulation: An *in vitro* study. *J. Contemp. Dent. Pract.* 2004, 5, 1, 18–30.
2. Fluorides and oral health. WHO Expert Committee on Oral Health Status and Fluoride Use. WHO Technical report Series, 1994, 846, 26–28.
3. *Brunn C., Lambrou D., Larsen M.J., Fejerskov O., Thylstrup A.*: Fluoride in mixed human saliva after different topical fluoride treatments and possible relation to caries inhibition. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 1992, 10, 2, 124–129.
4. *Lagerlof F., Oliveby A.*: Caries-protective factors in saliva. *Adv. Dent. Res.* 1994, 8, 2, 229–238.
5. *Lagerweij M.D., Cate ten J.M.*: Remineralisation of enamel lesions with daily applications of a high-concentration fluoride gel and a fluoridated toothpaste: An *in situ* study. *Caries Res.* 2002, 36, 2, 270–274.

6. Lynch R.J., Navada R., Walia R.: Low-levels of fluoride in plaque and saliva and their effects on the demineralisation and remineralisation of enamel: role of fluoride toothpastes. *Int. Dent. J.* 2004, 54, Suppl. 1, 304–309.
7. Madlena M., Nagy G., Gabris K., Marton S., Kesztheelyi G., Banoczy J.: Effect of amine fluoride toothpaste and gel in high risk groups of Hungarian adolescents: Results of a longitudinal study. *Caries Res.* 2002, 36, 2, 142–146.
8. Petzold M.: The influence of different fluoride compounds and treatment conditions on dental enamel: A descriptive in vitro study of the CaF₂ precipitation and microstructure. *Caries Res.* 2001, 35, 1, 45–51.
9. Shani S., Friedman M., Steinberg D.: The anticariogenic effect of amine fluorides on *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase in biofilms. *Caries Res.* 2000, 34, 3, 260–267.
10. Zero D.T., Raubertas R.F., Fu J., Pedersen A.M., Hayes A.L., Featherstone J.D.: Fluoride concentrations in plaque, whole saliva, and ductal saliva after application of home-use topical fluorides. *J. Dent. Res.* 1992, 71, 1768–1775.
11. Zimmer S., Jahn K.-R., Barthel C.R.: Recommendations for the use of fluoride in caries prevention. *Oral Health Prev. Dent.* 2003, 1, 1, 45–51.
12. Ten Cate J.M., Larsen M.J., Pearce E.I.F., Fejerskov O.: Chemical interactions between the tooth and oral fluids. In: *Dental caries*. Eds: O. Fejerskov, E.A.M. Kidd. Blackwell Munksgaard 2003, 66–67.
13. Sjogren K., Melin N.H.: The influence of rinsing routines on fluoride retention after toothbrushing. *Gerodontology*, 2001, 18, 1, 15–20.
14. Kaczmarek U.: Mechanizmy kariostatyczne fluoru. *Czas. Stomatol.* 2005, 58, 6, 404–413.
15. Ellwood R., Fejerskov O.: Clinical use of fluoride. In: *Dental caries*. Eds: O. Fejerskov, E.A.M. Kidd. Blackwell Munksgaard 2003, 207–213.
16. Campus G., Lallai M.R., Carboni R.: Fluoride concentration in saliva after use of oral hygiene products. *Caries Res.* 2003, 37, 1, 66–70.
17. Duckworth R.M., Morgan S.N.: Oral fluoride retention after use of fluoride dentifrices. *Caries Res.* 1991, 25, 1, 123–129.
18. Duckworth R.M., Stewart D.: Effect of mouthwashes of variable NaF concentration but constant NaF content on oral fluoride retention. *Caries Res.* 1994, 28, 1, 43–47.
19. Duckworth R.M., Knoop D.T., Stephen K.W.: Effect of mouthrinsing after toothbrushing with fluoride dentifrice on human salivary levels. *Caries Res.* 1991, 25, 1, 287–291.
20. Machiulskiene V., Ricahrs A., Nyvad B., Baelum V.: Prospective study of the effect of post-brushing rinsing behaviour on dental caries. *Caries Res.* 2002, 36, 5, 301–307.
21. Issa A.I., Tumba K.J.: Oral fluoride retention in saliva following toothbrushing with child and adult dentifrices with and without water rinsing. *Caries Res.* 2004, 38, 1, 15–19.
22. Kaczmarek U., Czajczyńska A., Gmyrek-Marciniak A., Grzesiak-Gasek I., Filipowski H.: Poziom fluoru w ślinie po szczotkowaniu zębów wybranymi pastami fluorkowymi. *Czas. Stomatol.* 2006, 59, 4, 238–244.
23. Ten Cate J.M., Exterkate R.A., Buijs M.J.: The relative efficacy of fluoride toothpastes assessed with pH cycling. *Caries Res.* 2006, 40, 2, 136–141.

DARIUSZ KLÓDKA, HELENA ZAKRZEWSKA

WYKORZYSTANIE SORPCYJNYCH WŁAŚCIWOŚCI KOŚCI DO OBNIŻENIA PONADOPTYMALNYCH STĘŻEŃ FLUORKÓW W WODZIE

THE USE OF SORPTIVE PROPERTIES OF BONE FOR REDUCING SUPRAOPTIMAL CONCENTRATIONS OF FLUORIDES IN WATER

Katedra Biochemii Akademii Rolniczej w Szczecinie
ul. Słowackiego 17, 71-434 Szczecin
Kierownik: prof. dr hab. Janina Nowak

Summary

Purpose: Due to industrialization, the content of fluorine in the environment increases leading to many adverse effects in living organisms. Uptake of fluoride by organisms differs, but almost 100% uptake from water is observed.

Material and methods: This study presents a simple method for removing an excess of fluorides from water down to levels considered not harmful by using animal bone as a sorbent. Sodium fluoride was dissolved in distilled water at 2 and 4 mg·dm⁻³. Bovine femoral bone slices or 3–8 mm bone particles were used as sorbent. The temperature was 10°C and 20°C.

Results: Bone not only lowered the fluoride content in the aqueous solution but increased that of Na, Ca, and Mg and eliminated some harmful heavy metals (Zn, Cu). Bone appears to be effective as a sorbent to reduce supraoptimal content of fluoride in drinking water.

K e y w o r d s: defluoridation – water – sorption – bone.

Streszczenie

Wstęp: Na skutek industrializacji zwiększa się zawartość fluoru w środowisku naturalnym, a tym samym w organizmach żywych dochodzi do wielu niekorzystnych zmian. Bioprzyjmawalność fluorków jest różna, ale prawie w 100% są one pobierane przez organizmy z wody.

Material i metody: W pracy przedstawiono prosty sposób usuwania nadmiernych ilości fluorku z wody do

wartości uznawanych za nieszkodliwe przy wykorzystaniu naturalnego sorbentu, jakim jest kość. Eksperyment dotyczył roztworów fluorku sodu, o stężeniu 2 i 4 mg·dm⁻³, przygotowanych na wodzie destylowanej. Doświadczenie przeprowadzono w temperaturze 10 i 20°C. Jako sorbent zastosowano kość udową krowy w postaci plastrów oraz w postaci rozdrobnionej o średnicy 3–8 mm.

Wyniki: Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić, że kość nie tylko obniża zawartość fluorku w badanym roztworze wodnym, ale wzbogaca go także w niektóre makroelementy, takie jak Na, Ca, Mg. Jednocześnie eliminuje szkodliwe dla zdrowia metale ciężkie (Zn, Cu). Istnieje możliwość praktycznego wykorzystania kości jako sorbentu do obniżenia ponadoptymalnych stężeń fluorków w wodzie pitnej.

H a s ł a: defluoryzacja – woda – sorpcja – kość.

Wstęp

Głównymi źródłami fluoru w organizmach żywych są: woda, powietrze i żywność. Wody pitne w Polsce zawierają stosunkowo niewielkie ilości tego pierwiastka, w granicach od 0,1 do 0,2 mg F·dm⁻³ [1]. Zawartość fluorków w wodzie do picia na terenie Pomorza Zachodniego waha się w zakresie od 0,08 do 0,28 mg F·dm⁻³ [2], a zawartość fluoru w powietrzu w pobliżu Zakładów Chemicznych „Police”, we wschodnich rejonach województwa zachodniopomorskiego, kształtuje się na poziomie 0,4 μg·m⁻³ [3]. Jednak coraz większe nagromadzenie związków fluoru w glebie

powoduje, że rozpuszczalne fluorki sodu lub potasu przechodzą w nierozpuszczalne fluorki magnezu i wapnia [4]. W ten sposób maleje biodostępność magnezu. Niedobór magnezu prowadzi do zahamowania ważnych reakcji enzymatycznych w organizmach żywych. Z kolei długoletnie narażenie na zawartość tego pierwiastka organizmów wyższych powoduje jego kumulację w tkankach twardych [5]. Dzieje się tak dlatego, gdyż głównym minerałem tkanki twardej jest hydroksyapatyt o wzorze $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, który wiąże jony fluorkowe na drodze wymiany z grupą hydroksylową.

Autorów pracy zainteresowała kość ze względu na jej wielorakie funkcje: podporową, buforową, sorpcyjną. Kryształy hydroksyapatytu w kości mają rozmiary około $200 \times 30 \times 70$ nm. Częsteczka składa się z centralnego jonu wapnia i z trzech związanych kompleksowo cząsteczek trójzasadowego fosforanu wapnia. Kryształy hydroksyapatytu ułożone są w piramidki równolegle przebiegających blaszek [6]. Taka budowa i rozdrobnienie powoduje, że 1 g kości ma ogromną powierzchnię wynoszącą 100–200 m². Właściwości te warunkują sprawną wymianę jonową. Niektóre składniki hydroksyapatytu mogą być wymieniane na jony o podobnym ładunku i o podobnej średnicy. Wapń może być zastępowany ołowiem, manganem, magnezem, sodem oraz strontem. Węglany mogą być zastępowane fosforanami lub grupą hydroksylową, natomiast grupa hydroksylowa – fluorkami, cytrynianami, szczawianami lub węglanami. Funkcję sorpcyjną kości postanowiono wykorzystać do oczyszczania wody z nadmiernej ilości fluorków, znajdujących się w oczkach wodnych lub do obniżania zawartości fluorków na tych terenach, gdzie zawartość fluorku w wodzie pitnej przewyższa dopuszczalne normy. Zamierzony cel realizowano poprzez:

- wstępne ustalenie proporcji powierzchni między istotą zbitą i istotą gąbczastą kości,
- sprawdzenie właściwości sorpcyjnych fragmentów kostnych zawierających obie warstwy budulcowe w procesie wymiany jonów fluorkowych z roztworów wodnych,
- sporządzenie kolumny ze sproszkowanej kości jako sorbentu w celu obniżenia ponadoptimalnych zawartości fluorków do zawartości uważanych za bezpieczne (ok. 0,5 mg·dm⁻³),
- zbadanie, jak zmienia się pH wody po pasażu przez kolumnę wypełnioną sorbentem kostnym.

Material i metody

Materiałem do badań były kości udowe krowy. Wstępnie kość oczyszczono mechanicznie, następnie przez gotowanie usunięto pozostałe resztki, na koniec odłuszczone przez zanurzenie w acetonie. Po wysuszeniu w temperaturze pokojowej kość pocięto brzeszczotem na poprzeczne plastry o grubości około 0,3–0,5 cm. W tak pociętych plastrach określono stosunek powierzchni istoty zbitej do istoty gąbczastej. Przygotowano roztwory NaF o stężeniu 2 i 4 mg

F·dm⁻³ na wodzie destylowanej. Następnie przygotowano dwie kolumny o średnicy 3 cm. W pierwszej umieszczono 3 g rozdrobnionych kości o średnicy 3–8 mm (na wysokość 3,5 cm). Dodano 100 cm³ roztworu NaF o stężeniu 4 mgF·dm⁻³ przygotowanego na wodzie destylowanej. Roztwór sączono przez kolumnę przez 2 h. Po tym czasie oznaczono w przesączu: stężenie jonów F⁻, pH, zawartość wybranych metali oraz zawartość fosforanów i węglanów. W drugiej kolumnie umieszczono 6 g rozdrobnionych kawałków kości o średnicy 3–8 mm (na wysokość 8 cm). Pozostałe czynności wykonano podobnie, jak przy kolumnie pierwszej.

Zawartość fluorków oznaczano metodą potencjometryczną przy użyciu miernika firmy Radelkis, zgodnie z metodą podaną przez *Durdę i wsp.* [7]. Określenie zawartości wybranych metali w kościach i roztworach wodnych dokonano przy użyciu spektrofotometru absorpcji atomowej Carl Zeiss Jena AASIN [8]. Zawartość węglanów oznaczono metodą acydymetryczną przy użyciu 0,1 M HCl, miareczkując wobec fenoftaleiny. Zawartość fosforanów oznaczono metodą kolorymetryczną [8], a określenie stosunku warstwy korowej do warstwy beleczkowej – metodą planimetryczną.

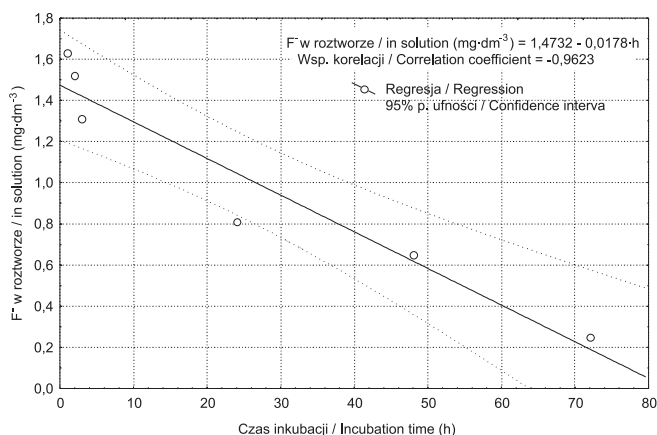
Wyniki

W pociętych poprzecznie kawałkach kostnych określono stosunek powierzchni istoty zbitej do istoty gąbczastej. Wartość średnia tego stosunku wyniosła $1:1,70 \pm 0,55$. Oznaczone zawartości wybranych makro- i mikroelementów w kości udowej krowy podano w tabeli 1.

W celu określenia właściwości sorpcyjnych kości przygotowano roztwory NaF w wodzie destylowanej o stężeniu 2 i 4 mg·dm⁻³ i wiano po 100 cm³ do polietylenowych kubeczków o pojemności 500 cm³ – pH ww. roztworów wynosiło odpowiednio 5,79 i 5,88. Następnie w roztworach tych zanurzono kawałki kości o masie 0,25 g i badano zdolność sorpcyjną kości po 1, 2, 3, 24, 48, 72 godzinach.

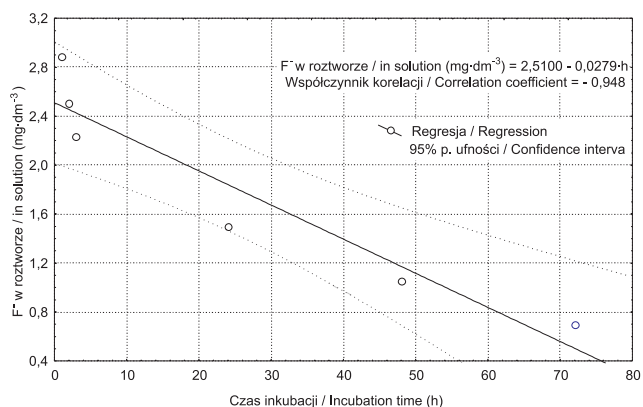
Zależność zmian stężenia jonów fluorkowych w roztworach o stężeniu 2 i 4 mg·dm⁻³ w temperaturze 20°C przedstawiono na rycinach 1 i 2. Zależność zmian stężenia jonów fluorkowych w roztworach, o stężeniu 2 i 4 mg·dm⁻³ w temperaturze 10°C przedstawiono na rycinach 3 i 4. Zależność stężenia fluorku w kościach (po sorpcji fluorku z roztworów wodnych NaF o stężeniu 2 i 4 mg·dm⁻³) i czasu inkubacji w temperaturze 20 i 10°C przedstawiono na rycinach 5 i 6.

W tabeli 2 zestawiono zmiany w badanych parametrach przed elucją (przed wprowadzeniem roztworu fluorku sodu do kolumny wypełnionej rozdrobnioną kością) i po elucji. Stężenie fluorku sodu w roztworze po przejściu przez kolumnę wypełnioną bardziej rozdrobnioną kością było mniejsze, a zatem drobniejsze ziarna kości wykazały większe zdolności sorpcyjne (tab. 3).



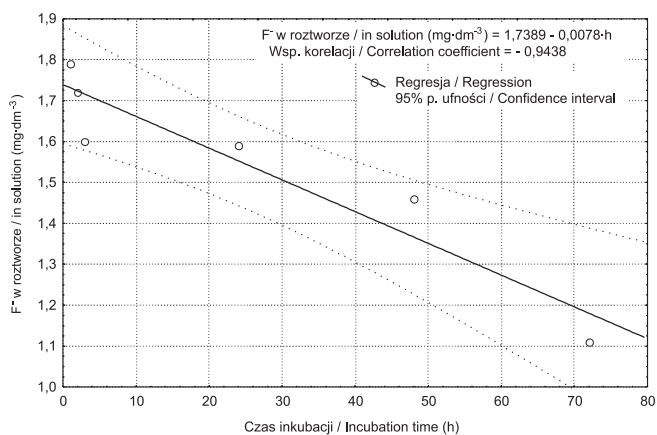
Ryc. 1. Korelacja pomiędzy zawartością fluorku sodu w roztworze ($2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) i czasem inkubacji w temperaturze 20°C

Fig. 1. Correlation between sodium fluoride content in the solution ($2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) and incubation time at 20°C



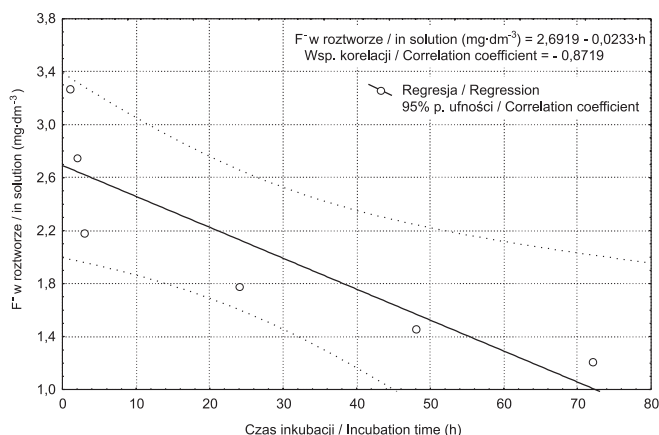
Ryc. 2. Korelacja pomiędzy zawartością fluorku sodu w roztworze ($4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) i czasem inkubacji w temperaturze 20°C

Fig. 2. Correlation between sodium fluoride content in the solution ($4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) and incubation time at 20°C



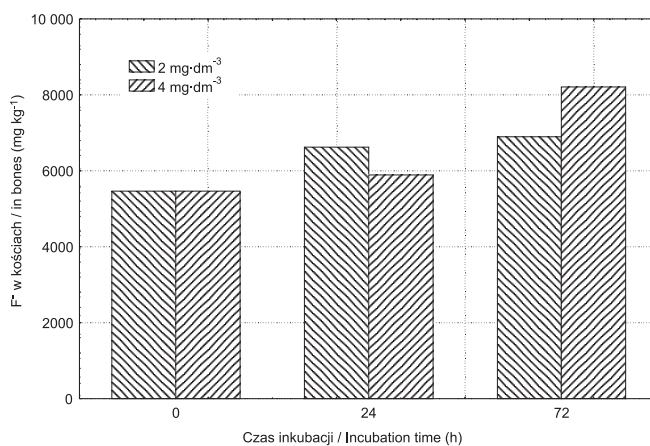
Ryc. 3. Korelacja pomiędzy zawartością fluorku sodu w roztworze ($2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) i czasem inkubacji w temperaturze 10°C

Fig. 3. Correlation between sodium fluoride content in the solution ($2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) and incubation time at 10°C



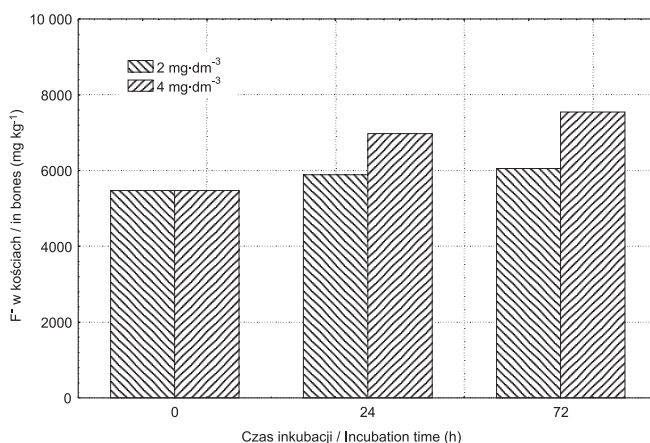
Ryc. 4. Korelacja pomiędzy zawartością fluorku sodu w roztworze ($4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) i czasem inkubacji w temperaturze 10°C

Fig. 4. Correlation between sodium fluoride content in the solution ($4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) and incubation time at 10°C



Ryc. 5. Stężenia F^- w kościach po defluoryzacji w temperaturze 20°C

Fig. 5. F^- content in bone after defluoridation at 20°C



Ryc. 6. Stężenia F^- w kościach po defluoryzacji w temperaturze 10°C

Fig. 6. F^- content in bone after defluoridation at 10°C

Dyskusja

Istnieje wiele sposobów na uzdatnianie wody pitnej: poprzez odwrotną osmozę, wymiennicze jonowe, koagulację, koprecypitację, katalityczną redukcję, ziołową filtrację,

elektrodializę i adsorpcję [9, 10, 11]. W doświadczeniu wykorzystano właściwości sorpcyjne kości do defluorkowania wód o podwyższonej zawartości fluorków – zarówno wód pitnych, jak i wód powierzchniowych oraz wód ze strumyków i oczek wodnych.

Tabela 1. Charakterystyka kości udowych krowy użytych do badań

Table 1. Characteristics of bovine femoral bones

	Zawartość niektórych makro- i mikroelementów Concentration of some macro- and microelements (mg/kg)					
	F ⁻	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Zn ⁺⁺	Fe ⁺⁺⁺	Cu ⁺⁺
	5558	295,1	6,99	0,299	0,120	0,014
	5352	299,0	7,03	0,303	0,112	0,016
	5510	293,3	6,68	0,295	0,124	0,032
X _{sr}	5473	295,8	6,9	0,299	0,118	0,02
SD	± 85,4	± 2,91	± 0,19	± 0,004	± 0,006	± 0,009

X_{sr} – wartość średnia / mean; SD – odchylenie standardowe / standard deviation

Tabela 2. Zmiany badanych parametrów przed doświadczeniem oraz po elucji

Table 2. Changes in the study parameters before and after elution

Parametry / Parameters	Zmiany badanych parametrów Changes in the study parameters		
	przed elucją before elution	po elucji / after elution	
Masa kości Mass of bone (g)	–	3	6
Czas inkubacji Incubation time (h)	–	2	2
Wielkość ziarna / Size of bone particles (mm)	3–8	3–8	3–8
pH	6,05	7,03↑	7,15↑
NaF (mg·dm ⁻³)	4,0	1,7↓	0,78↓
PO ₄ ⁻³ (mg·dm ⁻³)	–	0,326↑	0,676↑
CO ₃ ⁺² (mg·dm ⁻³)	–	–	–
Ca ⁺² (mg·dm ⁻³)	0,309	0,754↑	1,169↑
Mg ⁺² (mg·dm ⁻³)	0,014	0,052↑	0,286↑
Na ⁺ (mg·dm ⁻³)	1,31	6,29↑	18,77↑
Zn ⁺² (mg·dm ⁻³)	0,063	0,016↓	0,037↓
Cu ⁺² (mg·dm ⁻³)	0,02	0,011↓	–

Tabela 3. Zależność pomiędzy stopniem rozdrobnienia kości a zdolnością sorpcyjną

Table 3. Correlation between size of bone particles and sorption capacity

Średnica ziaren kości Size of bone particles (mm)	F ⁻ (mg·dm ⁻³)		pH roztworu pH of solution	
	start	po 2 h after 2 h	start	po 2 h after 2 h
3	5,9	2,95	5,88	7,15
3–8	5,9	3,27	5,88	7,00

W literaturze przedmiotu spotykamy różnego rodzaju materiały występujące jako sorbenty zawierające węgiel, takie jak: węgiel drzewny [12, 13], spopielone skorupy orzecha kokosowego [14], popiół z much [15] oraz popiół kostny [16, 17].

Kość stanowi wyjątkowo tani sorbent o ogromnej pojemności sorpcyjnej. Teoretycznie w fluoroapatycie o wzorze Ca₁₀(PO₄)₆F₂, w którym obie grupy hydroksylowe zostały podstawione jodem fluorkowym, zawartość fluoru wynosi 3,766%, co stanowi 37 669 mgF·kg⁻¹ fluoroapatytu.

W przeprowadzonych badaniach kość zawierająca około 50% hydroksyapatytu po inkubacji zawierała 7007 i 13 252 mg fluoru w temp. 20°C oraz 6892 i 8211 mg fluoru w temp. 10°C (ryc. 5, 6), co stanowi 20% wysycenia fluorkiem. Zatem kość tę można nadal wykorzystywać do wiązania nowych jonów fluorkowych, gdyż jej pojemność sorpcyjna została wysycona tylko w 20%. Dla przykładu pojemność sorpcyjna popiołu kostnego kształtuje się między 1,8–2,2 mg fluorku na 1 g popiołu [12].

Dla każdego procesu sorpcyjnego istotne jest zachowanie równowagi termicznej i pH [9]. Zastosowane wartości temperatury, wynoszące 20 i 10°C, w badaniach są pewną wypadkową temperatur wody wodociągowej i wody ze zbiorników otwartych wód powierzchniowych. Zauważono, iż w wyższej temperaturze sorpcja fluorków przez kość jest efektywniejsza, co może wskazywać na udział chemisorpcji w tych układach – jest to zgodne z wynikami badań *Abe i wsp.* [13]. Zauważono istotną ujemną korelację, potwierdzoną statystycznie, pomiędzy zawartością fluorków w roztworze a czasem inkubacji we wszystkich zastosowanych układach (ryc. 1–4). Na kinetykę sorpcji fluorków przez kość może mieć również wpływ pH (wodociągowa woda alkaliczna, destylowana woda kwaśna).

Zestawienie badanych parametrów roztworu przepuszczonego przez kolumny wypełnione rozdrobnioną kością na początku elucji oraz na końcu pasaży przedstawiono w tabeli 2. Zauważono wzrost pH roztworu, pojawiły się uwalniane przez kość pierwiastki (Na, Ca, Mg oraz PO₄⁻³). Natomiast kość wychwytuje z roztworu wodnego jony cynku i miedzi. Woda staje się bogatsza w korzystne makroelementy, a ubytek metali poprawia jej klasę czystości.

Wnioski

1. Kość można uważać za łatwo dostępny sorbent usuwający z roztworu wodnego nie tylko fluorki, ale także niektóre metale ciężkie.
2. Poprzecznie pocięta kość długa, nawleczona na linkę, może służyć do defluorkowania powierzchniowych wód lub wód z płynących strumyków.
3. Kolumna adsorpcyjna, wypełniona sproszkowaną kością, stanowi prosty model urządzenia do odfluorkowania wody. Może on być podstawą do opatentowania urządzenia.
4. Kość doskonale nadaje się do wychwytywania z wody szkodliwych dla zdrowia metali ciężkich i wzbogacania jej w takie pierwiastki, jak wapń, magnez i sód.

Piśmiennictwo

1. *Machoy Z.*: Fluor i jego wpływ na zwierzęta i człowieka. Szkodliwość zanieczyszczeń chemicznych dla człowieka i zwierząt. Ossolineum, Wrocław 1990, 57–75.
2. *Zakrzewska H., Materny M.*: Ocena zawartości fluorków w łóżyskach owiec pochodzących z terenów Pomorza Zachodniego. VIII Sympozjum

- Fluorowe: Fluor i biopierwiastki w biologii i medycynie. Szczecin, 23–24 kwietnia 1998, 33–38.
3. Klódka D., Musik D., Reutt K., Wójcik K.: Wpływ Zakładów Chemicznych „Police” na zawartość fluoru w wybranych elementach środowiska. Kierunki badawcze młodzieży akademickiej. In: Nauki przyrodnicze. Red: K. Jankowski, M.R. Ilczuk, R. Dąbrowski. Wyd. Akad. Podl. Siedlce 2005, 137–140.
 4. Floriańczyk B.: Fluor w środowisku człowieka. Ekopartner, 1996, 27.
 5. Zakrzewska H.: Ocena wybranych parametrów surowicy krwi i kości u owiec z terenów Pomorza Zachodniego o różnym skażeniu środowiska. Szczec. Roczn. Nauk. – Ann. Sci. Stettin, 1996, 10 (1), 105–125.
 6. Aurich H.: Laboratorium życia. Wiedza Powszechna, Warszawa 1974, 265–271.
 7. Durda A., Machoy Z., Siwka W., Samujło D.: Ocena sposobów przygotowania materiału badawczego do oznaczania fluorków. Bromat. Chem. Toksykol. 1986, 19 (4) 209–213.
 8. Dąbkowska E., Machoy Z.: Effects of fluoride on calcium and magnesium content of mandibles (lower jaws) of wild game. Fluoride, 1989, 22 (1), 29–32.
 9. Gopal K., Srivastava S.B., Shukla S., Berssillon J.L.: Contaminants in drinking water and its mitigation using suitable adsorbents: an overview. J. Environ. Biol. 2004, 25 (4), 469–475.
 10. Chow W., Chen Y.K.: The removal of fluorides from water by adsorption. J. Am. Wat. Works Assoc. 1979, 10, 5622–5670.
 11. Larsen M.J., Pearce E.I.: Partial defluoridation of drinking water using fluorapatite precipitation. Caries Res. 1992, 26 (1), 22–28.
 12. Mwaniki D., Nagelkerke N.: Sorption kinetics of fluoride in drinking water by bone charcoal columns. Frontiers of medical and biological engineering. Int. J. Japan Soc. Med. Electronics Biol. Eng. 1990, 2 (4), 303–308.
 13. Abe I., Iwasaki S., Tokimoto T., Kawasaki N., Nakamura T., Tanada S.: Adsorption of fluoride ions onto carbonaceous materials. J. Colloid Interface Sci. 2004, 275 (1), 35–39.
 14. Arulanantham A., Ramakrishna T.V., Balasubramaniam N.: Studies on fluoride removal by coconut shell carbon. IJEP, 1992, 7, 531–536.
 15. Chaturvedi A.K., Yadava K.P., Pathak K.C., Singh V.N.: Defluoridation of water by adsorption on fly ash. Water Air. Soil Pollut. 1990, 49 (1–2), 51–56.
 16. Phantumvanit P., LeGeros R.Z.: Characteristics of bone char related to efficacy of fluoride removal from highly-fluoridated water. Fluoride, 1997, 30 (4), 207–218.
 17. Alferedo D., Manfred S., Luciano M., Sengo Z., Andrea G.: Study on the adsorption capacity of the system clay carbon for water treatment. Toxicol. Env. Chemistry, 1992, 35, 87–92.

PIOTR KOŚCIOR, URSZULA KACZMAREK¹

DŁUGOTERMINOWE UWALNIANIE JONÓW FLUORKOWYCH Z WYBRANYCH CEMENTÓW SZKŁO-JONOMEROWYCH – BADANIA IN VITRO

LONG TERM RELEASE OF FLUORIDE FROM SELECTED GLASS-IONOMER CEMENTS – IN VITRO STUDY

Zakład Propedeutyki Stomatologicznej Akademii Medycznej we Wrocławiu
¹ Katedra i Zakład Stomatologii Zachowawczej i Dziecięcej Akademii Medycznej we Wrocławiu
ul. Krakowska 26, 50-425 Wrocław
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Urszula Kaczmarek

Summary

Introduction: Conventional and resin modified glass-ionomer cements according to their physico-chemical properties are widely used in dental treatment. The main advantages of these materials are chemical bonding to hard dental tissues and high level of fluoride release.

The aim of this study was to compare the fluoride release of selected glass-ionomer cements in vitro conditions.

Material and methods: Conventional glass-ionomer cement Ionofil Molar and resin modified glass ionomer cement – Vitremer were examined. Samples of the materials were placed in saline and deionised water. Fluoride concentration measurements were carried out using ORION 9609 electrode, after 1, 3, 24, 48, 72, 168 hours and next every 168 hours (7 days) until 2352 hour (98 days).

Results: Significantly higher concentration level of fluoride released from resin modified cement (Vitremer) was obtained for saline and deionized water than conventional cement Ionofil Molar. Cumulative fluoride release in saline after 14 weeks for Vitremer was $256.87 \pm 15.77 \mu\text{g F}/\text{mm}^2$ and for Ionofil Molar $206.61 \pm 20.01 \mu\text{g F}/\text{mm}^2$. For both materials the dynamics of fluoride release was the highest within the first 24 hours, and sharply decreased in next intervals.

Conclusions: Resin modified glass-ionomer cement Vitremer released highest amount of fluoride than conventional glass-ionomer cement Ionofil Molar. Similar level of fluoride emission into deionised water and saline was observed.

Key words: glass-ionomer cements – fluoride release – extraction media.

Streszczenie

Wstęp: Cementy szkło-jonomerowe konwencjonalne i modyfikowane żywicą ze względu na właściwości fizykochemiczne znalazły szerokie zastosowanie w leczeniu stomatologicznym. Głównymi ich zaletami jest chemiczne łączenie się z tkankami zęba i wysoki poziom uwalniania jonów fluorkowych.

Material i metody: Celem pracy było porównanie poziomu uwalniania fluorków z wybranych cementów szkło-jonomerowych w warunkach in vitro. Badaniom poddano konwencjonalny cement szkło-jonomerowy Ionofil Molar modyfikowany żywicą Vitremer. Próbkki materiałów umieszczano w roztworze soli fizjologicznej i wodzie dejonizowanej. Pomiaru stężeń jonów fluorkowych wykonywano przy użyciu elektrody ORION 9609 po upływie: 1, 3, 24, 48, 72, 168 godzin i kolejno, co 168 godzin (7 dni) do 2352 godzin (98 dni).

Wyniki: Wykazano istotnie wyższy poziom uwalniania fluorków z materiału Vitremer do soli fizjologicznej i wody dejonizowanej. Maksymalna skumulowana ilość uwolnionych fluorków po okresie 14 tygodni dla tego materiału w roztworze soli fizjologicznej wynosiła $256,87 \pm 15,77 \mu\text{g F}/\text{mm}^2$, natomiast dla materiału Ionofil Molar $206,61 \pm 20,01 \mu\text{g F}/\text{mm}^2$. Największą dynamikę uwalniania fluorków w przypadku obu materiałów zaobserwowano w pierwszych 24 godzinach, natomiast w kolejnych okresach znacząco malała.

Wnioski: Modyfikowany żywicą cement szkło-jonomerowy Vitremer uwalnia więcej jonów fluorkowych niż konwencjonalny cement szkło-jonomerowy Ionofil Molar. Stwierdzono zbliżony poziom emisji fluorków do wody i soli fizjologicznej.

H a s ł a: cementy szkło-jonomerowe – uwalnianie fluoru – środowiska ekstrakcyjne.

Wstęp

Cementy szkło-jonomerowe są jedną z podstawowych grup materiałów stosowanych w leczeniu stomatologicznym. Przez ostatnie kilkanaście lat poddawano ich skład licznym modyfikacjom, aby wyeliminować wady oraz poszerzyć możliwości ich stosowania. Na bazie konwencjonalnych cementów szkło-jonomerowych powstały: cementy szkło-jonomerowe wzmocnione dodatkiem metalu (tzw. cermet), cementy szkło-jonomerowe modyfikowane żywicą oraz nowe materiały łączące w pewnej mierze właściwości szkło-jonomerów i kompozytów – kompomery i giomery. Niewątpliwą zaletą wszystkich rodzajów cementów szkło-jonomerowych jest wysoki i długotrwały poziom uwalniania fluorków oraz możliwość pobierania fluorków ze środowiska.

Celem pracy było porównanie uwalniania jonów fluorkowych z wybranych materiałów szkło-jonomerowych.

Material i metody

Badaniom poddano konwencjonalny cement szkło-jonomerowy Ionofil Molar oraz modyfikowany żywicą cement szkło-jonomerowy Vitremer.

Z materiałów sporządzono próbki w kształcie walca wykonane w matrycy polietylenowej. Obliczono ich powierzchnię kontaktową, a następnie zanurzono w roztworach 0,1 mol/L NaCl (sól fizjologiczna) i w wodzie dejonizowanej w zamkniętych pojemnikach i przechowywano w temperaturze 37°C.

Do oznaczania jonów fluorkowych uwalnianych z materiałów zastosowano jonowoselektywną elektrodę ORION model 9609 w połączeniu z mikrokomputerem pH/jonometr CPI- 551 Elmetron. System kalibrowano przed każdym kolejnym oznaczeniem. Oznaczenia wykonywano dla 3 próbek materiałów umieszczanych w obu środowiskach i obliczano wartości średnie trzykrotnych ich pomiarów. Czas obserwacji wynosił 14 tygodni (2352 godziny), a pomiary wykonywano po upływie 1, 3, 24, 48, 72, 168 godzin i kolejno w odstępach tygodniowych (co 168 godz.). Uzyskane dane przedstawiono jako skumulowane uwalnianie jonów fluorkowych, obliczone na powierzchnię materiału ($\mu\text{g F/mm}^2$).

W analizie statystycznej otrzymanych danych obliczono wartość średnią, odchylenie standardowe, współczynnik korelacji liniowej przy użyciu testu t-Studenta i testu Friedmana.

Wyniki

Istotnie wyższą ($p < 0,001$) skumulowaną emisję fluorków do wody dejonizowanej wykazywał modyfikowany żywicą cement szkło-jonomerowy Vitremer ($244,52 \pm 1,56 \mu\text{g F/mm}^2$) w porównaniu z konwencjonalnym cementem Ionofil Molar ($180,73 \pm 13,89 \mu\text{g F/mm}^2$). Oba materiały największą emisję fluorków ujawniły między 1. a 3. godziną zanurzenia w wodzie (Vitremer $2,32 \mu\text{g F/mm}^2/\text{godz.}$, Ionofil Molar $2,63 \mu\text{g F/mm}^2/\text{godz.}$) – tabela 1. W kolejnym okresie, obejmującym 21 godzin (tj. między 3. a 24. godziną) uwalnianie fluorków z obu materiałów obliczone w odniesieniu do jednostki czasu – godziny obniżało się o ponad 60%.

W roztworze soli fizjologicznej, podobnie jak w wodzie dejonizowanej, znamiennie wyższą ($p < 0,000002$) emisję wykazał modyfikowany żywicą cement szkło-jonomerowy Vitremer ($256,87 \pm 15,77 \mu\text{g F/mm}^2$) w porównaniu z cementem konwencjonalnym Ionofil Molar ($206,61 \pm 20,01 \mu\text{g F/mm}^2$). Uwalnianie jonów fluorkowych wzrastało wraz z czasem przebywania próbek w roztworze soli. Wyższą emisję fluorków wykazał po upływie 1 godziny od zanurzenia w roztworze Vitremer ($5,83 \mu\text{g F/mm}^2/\text{godz.}$) niż Ionofil Molar ($1,92 \mu\text{g F/mm}^2/\text{godz.}$). Po dalszych 2 godzinach zauważono spadek emisji o 88% dla materiału Vitremer, a tylko o 7% dla materiału Ionofil Molar. W ciągu następnych 21 godzin nastąpiło dalsze obniżenie tempa uwalniania jonów dla materiału Vitremer o 3%, a dla Ionofil Molar o 47% (tab. 2).

Dyskusja

Dotychczas przeprowadzone badania [1, 2] wskazują, że cementy szkło-jonomerowe konwencjonalne i modyfikowane żywicą w porównaniu z innymi materiałami cechują się wysokim poziomem uwalniania jonów fluorkowych. Związane jest to w dużej mierze z tym, że źródłem fluoru w cementach szkło-jonomerowych jest, stanowiące podstawowy ich składnik, szkło fluoro-barowo-glinowo-krzemowe. Uwalnianie fluorków z konwencjonalnych cementów przypisywane jest utwardzaniu opartym na reakcji kwas-zasada szkła zawierającego fluor i płynu będącego polikwasem. W cementach modyfikowanych obecność żywicy aktywowanej światłem nie utrudnia emisji jonów i stąd wykazują one potencjalną zdolność uwalniania fluorków równą konwencjonalnym cementom [3, 4]. Wysokie stężenie fluorków, obserwowane w pierwszych dniach, nazywane jest efektem wybuchu (*burst effect*), co prawdopodobnie wywołane jest uwalnianiem jonów z cząsteczek szkła po ich rozpuszczeniu w kwasie polialkenowym podczas reakcji twardnienia. Dalsze, powolne uwalnianie jest wynikiem rozpuszczania szkła w zakwaszonej wodzie żywicy hydrożelowej [5, 6]. Dane własne potwierdzają podobny schemat uwalniania.

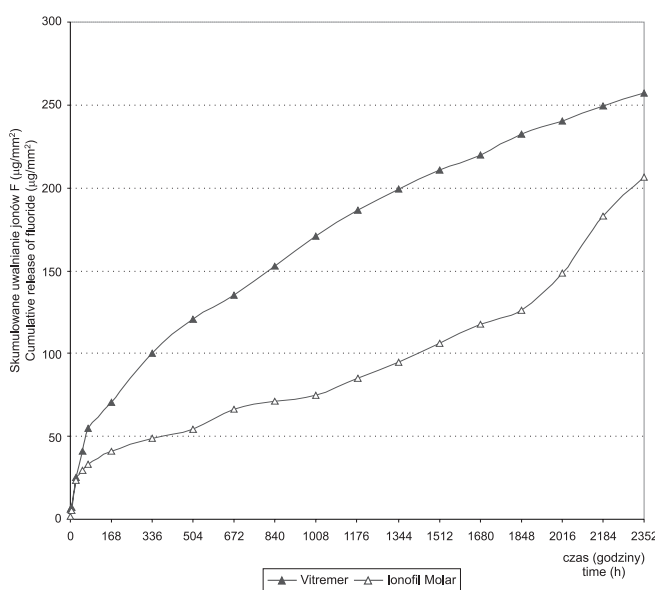
Porównując uwalnianie jonów fluorkowych z materiału Vitremer i Ionofil Molar do soli fizjologicznej, po upływie

Tabela 1. Skumulowane uwalnianie jonów fluorkowych z materiałów szkło-jonomerowych do wody dejonizowanej ($\mu\text{g F/mm}^2$)

Table 1. Cumulative release of fluoride ions from glass-ionomer cements into deionized water ($\mu\text{g F/mm}^2$)

Czas / Time (godz. / h)	Vitremer $\mu\text{g F/mm}^2$ (\pm SD)	Ionofil Molar $\mu\text{g F/mm}^2$ (\pm SD)
1	1,42 (\pm 0,14)	1,83 (\pm 0,16)
3	6,07 (\pm 0,31)	7,10 (\pm 0,41)
24	21,98 (\pm 1,11)	26,00 (\pm 0,30)
48	34,88 (\pm 1,04)	36,57 (\pm 0,98)
72	45,33 (\pm 0,84)	43,84 (\pm 1,25)
168	69,98 (\pm 3,90)	61,60 (\pm 3,54)
336	95,65 (\pm 4,65)	81,24 (\pm 5,00)
504	119,22 (\pm 3,66)	99,69 (\pm 6,41)
672	133,25 (\pm 3,14)	113,55 (\pm 6,86)
840	144,73 (\pm 3,54)	122,10 (\pm 7,01)
1008	156,94 (\pm 3,34)	130,06 (\pm 8,66)
1176	170,71 (\pm 2,51)	140,07 (\pm 10,77)
1344	184,50 (\pm 2,07)	146,45 (\pm 11,18)
1512	198,61 (\pm 1,52)	153,04 (\pm 11,89)
1680	213,19 (\pm 1,03)	160,26 (\pm 12,55)
1848	224,49 (\pm 2,32)	167,98 (\pm 14,20)
2016	229,47 (\pm 2,21)	171,15 (\pm 14,50)
2184	238,19 (\pm 1,61)	175,28 (\pm 13,93)
2352	244,52 (\pm 1,56)	180,73 (\pm 13,89)
Współczynnik korelacji Correlation coefficient	0,968	0,9453

Chi² ANOVA (n = 19, df 1) = 6,368421 p 001162
 Współczynnik zgodności = 0,33518 r śred. rang = 0,29825
 Chi² ANOVA (n = 19, df 1) = 6,368421 p 0,001162
 Concordance coefficient = 0,33518 r mean rank = 0,29825



Ryc. 1. Skumulowane uwalnianie jonów fluorkowych z materiałów szkło-jonomerowych do roztworu soli fizjologicznej ($\mu\text{g F/mm}^2$)

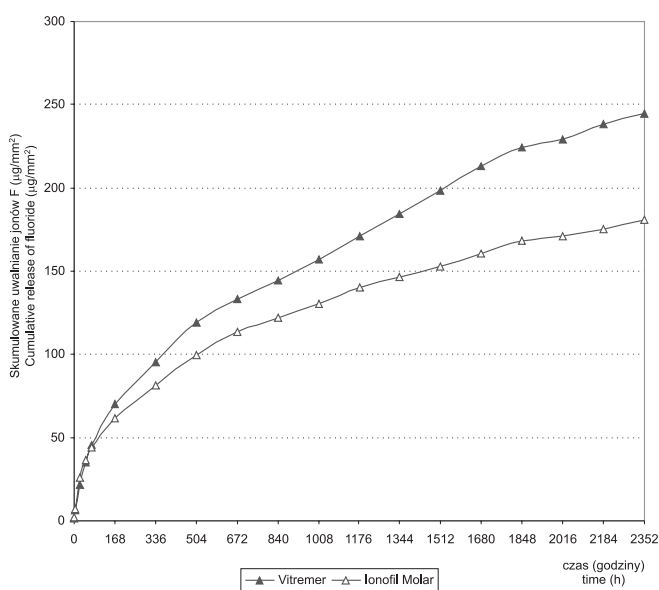
Fig. 1. Cumulative release of fluoride ions from glass-ionomer cements into saline ($\mu\text{g F/mm}^2$)

Tabela 2. Skumulowane uwalnianie jonów fluorkowych z materiałów szkło-jonomerowych do roztworu soli fizjologicznej ($\mu\text{g F/mm}^2$)

Table 2. Cumulative release of fluoride ions from glass-ionomer cements into saline ($\mu\text{g F/mm}^2$)

Czas / Time (godz.)	Vitremer $\mu\text{g F/mm}^2$ (\pm SD)	Ionofil Molar $\mu\text{g F/mm}^2$ (\pm SD)
1	5,83 (\pm 0,87)	1,92 (\pm 0,22)
3	7,18 (\pm 1,03)	5,47 (\pm 0,58)
24	25,55 (\pm 2,96)	23,42 (\pm 2,53)
48	40,78 (\pm 4,79)	29,32 (\pm 2,82)
72	54,86 (\pm 7,04)	33,25 (\pm 3,14)
168	70,43 (\pm 10,46)	40,89 (\pm 2,89)
336	100,14 (\pm 8,98)	48,68 (\pm 4,28)
504	120,61 (\pm 5,57)	54,32 (\pm 4,68)
672	135,05 (\pm 9,26)	66,52 (\pm 11,40)
840	152,84 (\pm 9,23)	70,94 (\pm 9,09)
1008	171,01 (\pm 9,10)	74,76 (\pm 7,37)
1176	186,35 (\pm 9,07)	85,22 (\pm 7,43)
1344	199,41 (\pm 9,63)	95,06 (\pm 8,31)
1512	210,91 (\pm 12,22)	106,34 (\pm 10,48)
1680	219,81 (\pm 13,15)	117,71 (\pm 10,56)
1848	232,38 (\pm 13,99)	126,18 (\pm 14,06)
2016	240,15 (\pm 14,61)	148,40 (\pm 13,87)
2184	249,05 (\pm 15,61)	183,07 (\pm 23,99)
2352	256,87 (\pm 15,77)	206,61 (\pm 20,01)
Współczynnik korelacji Correlation coefficient	0,9688	0,9729

ANOVA Friedmana i współczynnik zgodności Kendalla ANOVA
 Chi² ANOVA (n = 19, df 1) = 19,00000 p 0,0001
 Współczynnik zgodności = 1,0000 r śred. rang = 1,0000
 Friedman's ANOVA and Kendall's concordance coefficient
 Chi² ANOVA (n = 19, df 1) = 19,00000 p 0,0001
 Concordance coefficient = 1,0000 r mean rank = 1,0000



Ryc. 2. Skumulowane uwalnianie jonów fluorkowych z materiałów szkło-jonomerowych do wody dejonizowanej ($\mu\text{g F/mm}^2$)

Fig. 2. Cumulative release of fluoride ions from glass-ionomer cements into deionized water ($\mu\text{g F/mm}^2$)

24 godzin zauważono prawie takie same poziomy. W kolejnych godzinach z próbek Ionofilu uwalnianych było coraz mniej fluorków, ale po upływie 1848 godz. (10 tygodni) zanotowano niewielki wzrost uwalniania (ryc. 1). Takich zmian tempa emisji fluorków nie zaobserwowano w wodzie dejonizowanej (ryc. 2). Występujące różnice w poziomach i dynamice uwalniania fluorków do wody dejonizowanej oraz soli fizjologicznej mogą wynikać z odmiennej siły jonowej tych środowisk. *Chan i wsp.* [7] w swoich badaniach uzyskali podobny do wyników własnych poziom uwalniania fluorków z materiału Vitremer do wody dejonizowanej. Badany przez nich konwencjonalny cement szkło-jonomerowy ChemFil wykazywał jednak mniej więcej dwukrotnie wyższy poziom uwalniania niż Vitremer. Na długoczasowe uwalnianie fluorków z cementów szkło-jonomerowych, utrzymujące się na stosunkowo wysokim poziomie, wpływa ich zdolność pochłaniania fluorków dostarczanych do środowiska jamy ustnej (fluorkowane pasty do zębów, płukanki, miejscowe aplikacje preparatami fluorkowymi są w stanie je także pochłaniać). Zjawisko to określane jest jako powtórne naładowanie (*recharge*) i przypomina ładowanie baterii [8, 9, 10, 11, 12, 13]. Dzięki tej właściwości materiały te pełnią funkcję rezerwuaru fluoru i mogą powodować wzrost fluoru w ślinie, płytce i twardych tkankach zęba, wywierając działanie kariostatyczne.

Wnioski

Modyfikowany żywicą cement szkło-jonomerowy Vitremer uwalnia więcej jonów fluorkowych niż konwencjonalny cement szkło-jonomerowy Ionofil Molar. Stwierdzono zbliżony poziom emisji fluorków do wody i soli fizjologicznej.

Piśmiennictwo

1. *Asmussen E., Peutzfeldt A.*: Long-term fluoride release from a glass ionomer cement, a compomer, and from experimental resin composites. *Acta Odontol. Scand.* 2002, 60, 93–97.
2. *Horsted-Bindslev P.*: Fluoride release from alternative restorative materials. *J. Dent.* 1994, 22, Suppl.
3. *Mitra S.B.*: In vitro fluoride release from light-cured glass-ionomer liner/base. *J. Dent. Res.* 1991, 70, 1, 75–78.
4. *Momoi Y., McCabe J.F.*: Fluoride released from light-activated glass-ionomer restorative cements. *Dent. Mater.* 1993, 9, 3, 151–154.
5. *De Moor R.J., Verbeeck R.M.H., De Maeyer E.A.P.*: Fluoride release profiles of restorative glass ionomer formulations. *Dent. Mater.* 1996, 12, 2, 88–95.
6. *Wiegand A., Buchalla W., Attin T.*: Review on fluoride-releasing restorative materials – Fluoride release and uptake characteristics, anti bacterial activity and influence on caries formation. *Dent. Mater.* 2006, 25, 2, 121–126.
7. *Chan W.D., Yang L., Wan W., Rizkalla A.S.*: Fluoride release from dental cements and composites: a mechanistic study. *Dent. Mater.* 2006, 22, 366–373.
8. *Yip H.K., Smales R.J.*: Fluoride release and uptake by aged resin-modified glass ionomers and a polyacid-modified resin composites. *Int. Dent. J.* 1999, 49, 2, 217–225.
9. *Olsson C., Emilson C.G., Brikked D.*: An in vitro study of fluoride release from a resin modified glass ionomer cement after exposure to toothpaste slurries of different pH. *Clin. Oral Investig.* 2000, 4, 4, 233–237.
10. *Hsiu-Ming H., Huang G.F., Chang H.H., Wang Y.L., Guo M.K.*: A continuous flow system for assessing fluoride release/uptake of fluoride-containing restorative materials. *Dent. Mater.* 2004, 20, 8, 740–749.
11. *Forsten L.*: Resin-modified glass ionomer cements: fluoride release and uptake. *Acta Odontol. Scand.* 1995, 53, 4, 222–225.
12. *Delbem A.C., Pedrini D., Franca J.G., Machado T.M.*: Fluoride release/recharge from restorative materials – effect of fluoride gels and time. *Oper. Dent.* 2005, 30, 6, 690–605.
13. *Cildir S.K., Sandalii N.*: Fluoride release/uptake of glass-ionomer cements and polyacid-modified composite resin. *Dent. Mater.* 2005, 24, 1, 92–97.

PIOTR KOŚCIOR, URSZULA KACZMAREK¹

KRÓTKOTERMINOWE UWALNIANIE JONÓW FLUORKOWYCH Z LAKU SZCZELINOWEGO CONSEAL F DO RÓŻNYCH ŚRODOWISK – BADANIA IN VITRO

SHORT-TERM FLUORIDE RELEASE FROM CONSEAL F FISSURE SEALANT IN SOME MEDIA – AN IN VITRO STUDY

Zakład Propedeutyki Stomatologicznej Akademii Medycznej we Wrocławiu
¹ Katedra i Zakład Stomatologii Zachowawczej i Dziecięcej Akademii Medycznej we Wrocławiu
ul. Krakowska 26, 50-425 Wrocław
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Urszula Kaczmarek

Summary

Introduction: Low fluoride concentrations constantly maintained in the oral cavity are important for caries prevention. Application of fissure sealants containing fluoride improves protection and reinforces caries prophylaxis.

The aim of this study was to assess the level of fluoride release from Con Seal F fissure sealant in different media.

Material and methods: Sealant samples were placed in (a) artificial saliva without calcium ions (Ca^{++}) at pH of 4.5, 5.5, 6.0, 7.0, and 7.5, (b) artificial saliva with calcium ions (Ca^{++}) at pH 4.5, and 5.5, (c) saline, and (d) deionized water. Fluoride concentration in solution was measured after 1, 3, 24, 48, 72, and 168 hours from the start of the experiment.

Results: The highest cumulative fluoride concentration was found in saline ($9.39 \pm 2.17 \mu\text{g F/mm}^2$), the lowest in artificial saliva at pH of 7.0 ($0.45 \pm 0.14 \mu\text{g F/mm}^2$). The highest fluoride emission was observed during the first three hours which then decreased to a low but relatively stable level.

Conclusion: The level of fluoride release from Con Seal F fissure sealant depends on composition and pH of the medium. Decrease in pH increased fluoride release. This property is essential for patients with low salivary pH and high risk of caries.

K e y w o r d s: fissure sealant – fluoride release – extraction media.

Streszczenie

Wstęp: Szczególne znaczenie dla profilaktyki próchnicy ma stale utrzymujące się, niewielkie stężenie jonów fluorkowych obecnych w środowisku jamy ustnej. Stosowanie laków szczelinowych z dodatkiem fluoru ma na celu zwiększenie ochronnego i zapobiegawczego działania przeciw próchnicy.

Celem pracy było określenie poziomu uwalniania jonów fluorkowych z laku szczelinowego Con Seal F do różnych środowisk.

Material i metody: Próbkę materiału umieszczano w roztworach sztucznej śliny o pH 4,5; 5,5; 6,0; 7,0; 7,5 bez jonów Ca^{++} oraz o pH 4,5; 5,5 z zawartością jonów Ca^{++} , a także w roztworze soli fizjologicznej i wodzie dejonizowanej. Poziom jonów fluorkowych w roztworach mierzono po upływie 1, 3, 24, 48, 72, 168 godzin.

Wyniki: Najwyższe skumulowane stężenie uwolnionych jonów fluorkowych występowało w środowisku soli fizjologicznej ($9,39 \pm 2,17 \mu\text{g F/mm}^2$), a najniższe w sztucznej ślinie o pH 7,0 ($0,45 \pm 0,14 \mu\text{g F/mm}^2$). Najwyższą emisję fluorków odnotowano w pierwszych trzech godzinach, następnie uwalnianie utrzymywało się na niskim i stosunkowo stałym poziomie.

Wniosek: Uwalnianie jonów fluorkowych z laku Con Seal F zależy od składu i pH środowiska. Obniżenie pH powoduje wzrost uwalniania jonów fluorkowych, co jest istotne u pacjentów z niskim pH śliny i wysokim ryzykiem próchnicy.

H a s ł a: lak szczelinowy – uwalnianie fluoru – środowiska ekstrakcyjne.

Wstęp

Podstawowym celem stosowania laków szczelinowych (*fissure sealants*) jest ochrona złożonej morfologicznie powierzchni żęba przed kariogennym oddziaływaniem środowiska jamy ustnej (bakterie kwasotwórcze umiejscowione w płytce nazębnej i węglowodany ulegające fermentacji). Ponadto, uwalnianie jonów fluorkowych z dodawanych do tych materiałów związków fluoru hamuje demineralizację i wspomaga procesy remineralizacyjne w otaczających tkankach żęba. Poziom uwalniania jonów fluorkowych z różnych materiałów stomatologicznych związany jest z ich matrycą, mechanizmem twerdnienia, zawartością fluoru oraz zmiennością środowiska jamy ustnej [1]. W badaniach *in vitro* wykazano, że skład chemiczny roztworów ekstrakcyjnych wpływa istotnie na ilość i dynamikę uwalniania jonów fluorkowych [2, 3]. Pojawiający się cyklicznie w środowisku jamy ustnej spadek pH śliny po każdym spożyciu węglowodanów wpływa również na zmiany w ilości uwalniania fluorków z materiałów [4, 5].

Material i metody

Ocenie poddano lak szczelinowy Conseal F, który jest materiałem złożonym, o płynnej konsystencji, zawierającym dodatek związków fluoru w postaci fluorku sodu. Próbkę laku wykonano w matrycy polietylenowej w kształcie walców. Po polimeryzacji próbkę polerowano i klimatyzowano oraz obliczono ich powierzchnię kontaktową w mm^2 . Następnie zanurzono je w dwóch roztworach ekstrakcyjnych i pozostawiano bez mieszania w zamkniętych pojemnikach, w temperaturze 37°C przez wybrany okres, do czasu pomiaru uwolnionych z materiału fluorków. Próbkę umieszczano w roztworze soli fizjologicznej, wodzie dejonizowanej oraz roztworach sztucznej śliny o pH 4,5; 5,5; 6,0; 7,0; 7,5 bez dodatku jonów wapnia i z ich zawartością w zakresach pH 4,5 i 5,5. Skład sztucznej śliny był następujący: NaCl (0,4 g), KCl (4,0 g), mocznik (1 g), $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (0,005 g), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ oraz jony wapnia w postaci $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,795 g). Wszystkie roztwory sporządzono na bazie wody dejonizowanej. Dla każdego środowiska zostały sporządzone trzy próbki materiału.

Do oznaczania jonów fluorkowych zastosowano jonowo-selektywną elektrodę ORION model 9609 w połączeniu z mikrokomputerem pH/jonometr CPI-551 Elmetron. System kalibrowano przed każdym kolejnym oznaczeniem. Oznaczenia powtarzano trzykrotnie i obliczano wartość średnią. Pomiar wykonywano po upływie 1, 3, 24, 48, 72, 168 godzin, tj. w okresie 7 dni. Do oznaczeń pobierano 5 mL eluatu, próbkę osuszano i przenoszono do nowego roztworu. Stężenia uwolnionych fluorków wyrażono w $\mu\text{mol/L}$ oraz w odniesieniu do powierzchni materiału. Określono

skumulowany – sumaryczny poziom uwalniania jonów fluorkowych (tj. łączny w całym danym okresie obserwacji) oraz przyrosty uwalniania w okresie 1 godziny. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, obliczając wartość średnią, odchylenie standardowe, współczynnik korelacji liniowej przy użyciu testu t-Studenta i testu Friedmana.

Wyniki

Najwyższe, skumulowane uwalnianie jonów fluorkowych występowało w środowisku soli fizjologicznej; po upływie 168 godzin wynosiło ono $9,39 \pm 2,17 \mu\text{g F/mm}^2$. Nieco niższe było uwalnianie do wody dejonizowanej ($7,71 \pm 1,08 \mu\text{g F/mm}^2$). Materiał zanurzony w roztworach sztucznej śliny uwalniał więcej fluorków przy pH kwaśnym, a mniej przy pH obojętnym i zasadowym. Przy obecności jonów Ca^{++} w roztworze uwalnianie fluorków z materiału było niższe, wynosiło odpowiednio przy pH 4,5 – $3,11 \pm 0,26 \mu\text{g F/mm}^2$, a przy pH 5,5 – $4,48 \pm 1,24 \mu\text{g F/mm}^2$. Niewielkie uwalnianie jonów fluorkowych stwierdzono w środowisku sztucznej śliny o pH 7,0 ($0,45 \pm 0,14 \mu\text{g F/mm}^2$) – tabela 1, 2, rycina 1.

Dynamika uwalniania fluorków do wszystkich środowisk ekstrakcyjnych była podobna, czyli najwyższa emisja występowała w pierwszych trzech godzinach, potem następował jej spadek i ustalenie uwalniania na niskim, stosunkowo stałym poziomie. Maksymalny przyrost stężeń uwolnionych fluorków do wody dejonizowanej stwierdzono po pierwszej godzinie badania i wynosił on $1,86 \mu\text{g F/mm}^2$ (tab. 3, ryc. 2).

Dyskusja

W pracy przeprowadzono ocenę uwalniania jonów fluorkowych do różnych środowisk ekstrakcyjnych. Z piśmiennictwa wynika, że najczęściej używanym roztworem jest woda dejonizowana [6, 7, 8, 9], a znacznie rzadziej sztuczna ślina i sól fizjologiczna [10, 11]. Używanie roztworów sztucznej śliny jako środowiska ekstrakcyjnego ma na celu symulację warunków zbliżonych do naturalnych, panujących w jamie ustnej.

Stwierdzono, że spadek pH środowiska (przy niezmiennym jego składzie) zwiększał uwalnianie jonów fluorkowych. Skumulowane uwalnianie jonów fluorkowych było 13-krotnie niższe w sztucznej ślinie o pH obojętnym w porównaniu ze śliną o pH 5,5 ($0,45 \pm 0,14 \mu\text{g F/mm}^2$ vs $5,90 \pm 4,36 \mu\text{g F/mm}^2$) (tab. 1). Dalsze obniżenie pH śliny do poziomu 4,5 powodowało spadek emisji o ok. 38%. Wzrost pH śliny z obojętnego w kierunku zasadowym [5, 7] zwiększał ok. 6-krotnie emisję fluorków. Suplementacja jonami wapnia roztworu sztucznej śliny o pH 4,5 obniżała uwalnianie jonów fluorkowych o 14%, a przy pH 5,5 o 24% (tab. 1, ryc. 1)

Uzyskane poziomy uwalniania jonów fluorkowych z laku Conseal F są podobne do innych tego typu materiałów stomatologicznych [10, 12, 13]. Jodkowska i Wagner [10, 11] określają uwalnianie fluorków do roztworu soli z laków

Tabela 1. Skumulowane uwalnianie jonów fluorkowych do różnych środowisk (µg F/mm²)
 Table 1. Cumulative release of fluoride ions into different media (µg F/mm²)

Czas (godz.) Time (hours)	Sz.ś. pH 4,5 (µg F/mm ²) (± SD)	Sz.ś. pH 5,5 (µg F/mm ²) (± SD)	Sz.ś. pH 6,0 (µg F/mm ²) (± SD)	Sz.ś. pH 7,0 (µg F/mm ²) (± SD)	Sz.ś. pH 7,5 (µg F/mm ²) (± SD)	Sz.ś. z / from Ca pH 4,5 (µg F/mm ²) (± SD)	Sz.ś. z / from Ca pH 5,5 (µg F/mm ²) (± SD)	Woda Water (µg F/mm ²) (± SD)	NaCl (µg F/mm ²) (± SD)
1	0,94 (± 0,32)	1,43 (± 0,73)	0,18 (± 0,03)	0,16 (± 0,02)	0,29 (± 0,06)	0,51 (± 0,08)	0,78 (± 0,39)	1,86 (± 0,11)	1,25 (± 0,04)
3	1,68 (± 0,65)	2,92 (± 2,12)	0,20 (± 0,03)	0,18 (± 0,02)	0,55 (± 0,11)	0,70 (± 0,08)	1,61 (± 0,68)	2,86 (± 0,12)	2,98 (± 0,90)
24	2,05 (± 0,94)	3,72 (± 2,77)	0,27 (± 0,10)	0,25 (± 0,08)	1,07 (± 0,44)	1,33 (± 0,08)	2,36 (± 0,77)	4,03 (± 0,23)	5,31 (± 1,46)
48	2,56 (± 1,17)	4,13 (± 2,97)	0,44 (± 0,11)	0,43 (± 0,12)	1,88 (± 0,65)	1,50 (± 0,16)	3,12 (± 0,87)	4,89 (± 0,45)	6,58 (± 1,94)
72	3,30 (± 1,43)	5,20 (± 3,94)	0,46 (± 0,11)	0,46 (± 0,11)	2,47 (± 0,67)	2,53 (± 0,35)	3,73 (± 0,93)	5,68 (± 0,67)	7,74 (± 2,14)
168	3,64 (± 1,50)	5,90 (± 4,36)	0,48 (± 0,11)	0,45 (± 0,14)	2,64 (± 0,71)	3,11 (± 0,26)	4,48 (± 1,24)	7,71 (± 1,08)	9,39 (± 2,17)
Wsp. korelacji Corr. coeff.	0,884	0,868	0,819	0,781	0,869	0,940	0,899	0,953	0,883

ANOVA Friedmana i współczynnik zgodności Kendalla / Friedman's ANOVA and Kendall's cocordance coefficient

Chi² ANOVA (n = 6, df 8) = 46,47566 p < 0001 / Chi² ANOVA (n = 6, df 8) = 46,47566 p < 0001

Współczynnik zgodności = 0,96824 r śred. rang = 0,96189 / Cocordance coefficient = 0.96824 r mean rank = 0.96189

Sz.ś. – sztuczna ślina / arificial saliva

Tabela 2. Skumulowane uwalnianie jonów fluorkowych do różnych środowisk (µg F/mm²) – test T dla dwóch zmiennych – istotność różnic
 Table 2. Cumulative release of fluoride ions into artificial saliva, water, and saline (µg F/mm²) – T test for two variables – significance of differences

Parametry Parameters	Sz.ś. pH 4,5	Sz.ś. pH 5,5	Sz.ś. pH 6,0	Sz.ś. pH 7,0	Sz.ś. pH 7,5	Sz.ś. z / from Ca pH 4,5	Sz.ś. z / from Ca pH 5,5	Woda	NaCl
NaCl	0,105251	0,814353	0,124686	0,125789	0,138050	0,129720	0,111896	0,844038	xxx
Woda / Water	0,261407	0,692823	0,213822	0,215176	0,246326	0,225930	0,303955	xxx	
Sz.ś. z / from Ca pH 5,5	0,645926	0,198745	0,141034	0,143585	0,182158	0,165065	xxx		
Sz.ś. z / from Ca pH 4,5	0,197788	0,175406	0,171996	0,180077	0,459117	xxx			
Sz.ś. pH 7,5	0,234319	0,191103	0,058714	0,064880	xxx				
Sz.ś. pH 7,0	0,181195	0,168736	0,377344	xxx					
Sz.ś. pH 6,0	0,178566	0,167412	xxx						
Sz.ś. pH 5,5	0,159473	xxx							
Sz.ś. pH 4,5	xxx								

Sz.ś. – sztuczna ślina / artificial saliva

Delton F i Fissurit F, otrzymali także podobne poziomy uwalniania jonów fluorkowych.

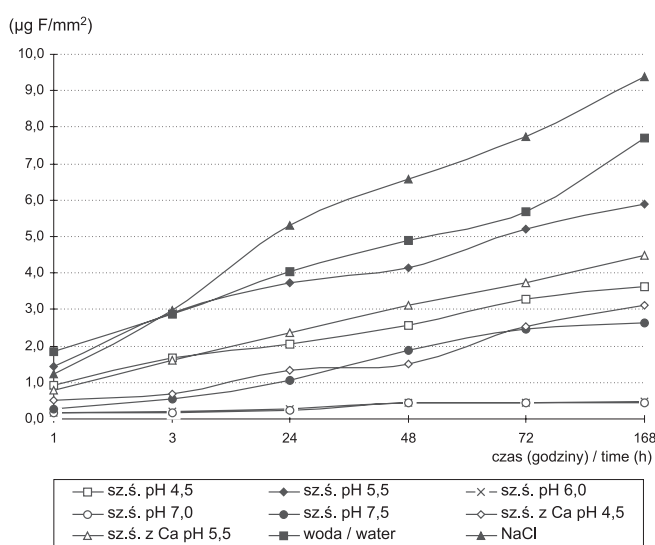
Szybkość uwalniania fluorków materiałów stomatologicznych nie jest stała i cechuje się szybką początkową emisją, która obniża się wraz z upływem czasu [14]. Garcia-Godoy i wsp. [6] zbadali 5 laków szczelinowych, wykazując największe uwalnianie z nich fluorków do wody destylowanej w czasie pierwszych 24 godzin, które obniżało się gwałtownie na drugi dzień i stopniowo w ciągu kolejnych dni utrzymując poziom mierzalny w okresie 30 dni. Dane własne potwierdzają podobną dynamikę uwal-

niania jonów fluorkowych z ocenianego laku Conseal F. Od materiałów stomatologicznych zawierających fluorki oczekiwane jest ich uwalnianie na poziomie zapewniającym hamowanie rozwoju próchnicy wtórnej. Takie działanie laków szczelinowych sugerują wyniki badań in vitro. Lobo i wsp. [15] w warunkach doświadczalnych, symulujących środowisko jamy ustnej (cykliczne zmiany pH, abrazja powierzchni laku) wykazali w szkliwie sąsiadującym zlakiem wzrost fluoru i zmniejszenie demineralizacji. Podobne wyniki uzyskali Hicks i wsp. [16], stwierdzając, że laki zawierające fluorki hamują indukowaną deminerali-

Tabela 3. Przyrosty uwalniania jonów fluorkowych na godzinę do różnych środowisk ($\mu\text{g F/mm}^2$)
 Table 3. Incremental release of fluoride ions per hour into artificial saliva, water, and saline ($\mu\text{g F/mm}^2$)

Czas (godz.) Time (hours)	Sz.ś. pH 4,5 ($\mu\text{gF/mm}^2$)	Sz.ś. pH 5,5 ($\mu\text{gF/mm}^2$)	Sz.ś. pH 6,0 ($\mu\text{gF/mm}^2$)	Sz.ś. pH 7,0 ($\mu\text{gF/mm}^2$)	Sz.ś. pH 7,5 ($\mu\text{gF/mm}^2$)	Sz.ś. z / from Ca pH 4,5 ($\mu\text{gF/mm}^2$)	Sz.ś. z / from Ca pH 5,5 ($\mu\text{gF/mm}^2$)	Woda Water ($\mu\text{gF/mm}^2$)	NaCl ($\mu\text{gF/mm}^2$)
1	0,940	1,430	0,180	0,160	0,290	0,510	0,780	1,860	1,250
3	0,370	0,745	0,010	0,010	0,130	0,095	0,415	0,500	0,865
24	0,018	0,038	0,003	0,003	0,025	0,030	0,036	0,056	0,111
48	0,021	0,017	0,007	0,008	0,034	0,007	0,032	0,036	0,053
72	0,031	0,045	0,001	0,001	0,025	0,043	0,025	0,033	0,048
168	0,004	0,007	0,000	0,000	0,002	0,006	0,008	0,021	0,017
Średnia Mean	0,231	0,380	0,034	0,030	0,084	0,115	0,216	0,418	0,391
Odch. st. SD	0,375	0,589	0,072	0,064	0,110	0,196	0,317	0,731	0,531
Wsp. korelacji Correlation coeff.	-0,566	-0,597	-0,439	-0,445	-0,625	-0,495	-0,610	-0,522	-0,649

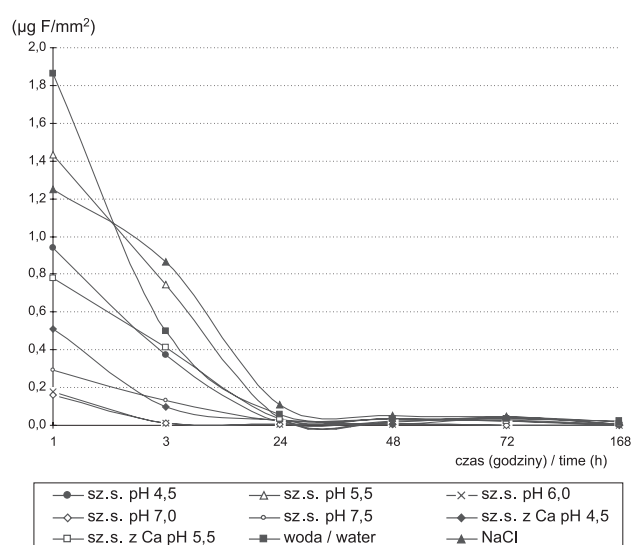
Sz.ś. – sztuczna ślina / artificial saliva



Ryc. 1. Skumulowane uwalnianie jonów fluorkowych do różnych środowisk ($\mu\text{F/mm}^2$)

Fig. 1. Cumulative release of fluoride ions into artificial saliva, water, and saline ($\mu\text{F/mm}^2$)

zaczę zarówno w tkankach zęba otaczających materiał, jak również na ścianie bruzdy. Wyniki *Rajtboriraksa* i *wsp.* sugerują, iż w warunkach klinicznych istnieje możliwość kariostatycznego działania uwalnianych z laków szczelinowych jonów fluorkowych [17]. Autorzy stwierdzili istotny wzrost fluoru w płytce po upływie 24 godzin od zastosowania laku Helioseal F, zawierającego – jako źródło fluoru – szkło fluorokrzemowe. Można się spodziewać, że wraz z czasem przebywania laku w jamie ustnej i emisji jonów fluorkowych wyczerpie się źródło fluoru w materiale. Zatem istotną cechą jest możliwość wchłaniania fluoru dostarczanego do środowiska jamy ustnej (fluorkowane pasty do zębów, płukanki, miejscowe aplikacje prepara-



Ryc. 2. Przyrosty uwalniania jonów fluorkowych do różnych środowisk ($\mu\text{F/mm}^2$)

Fig. 2. Incremental release of fluoride ions per hour in into artificial saliva, water, and saline ($\mu\text{F/mm}^2$)

tów fluorkowych). Jednakże, jak wynika z badań *Koga i wsp.* [18], laki szczelinowe oparte za żywicy (Helioseal F, Teethmate F) nie pochłaniają fluoru z aplikowanych preparatów fluorkowych, co sugeruje ich ograniczone w czasie działanie kariostatyczne.

Wnioski

Uwalnianie jonów fluorkowych z laku Conseal F zależy od składu i pH środowiska. Obniżenie pH powoduje wzrost uwalniania jonów fluorkowych, co jest istotne u pacjentów z niskim pH i wysokim ryzykiem próchnicy.

Piśmiennictwo

1. *Wiegand A., Buchalla W., Attin T.*: Review on fluoride-releasing restorative materials – Fluoride release and uptake characteristics, anti bacterial activity and influence on caries formation. *Dent. Mater.* 2006, 25, 2, 121–126.
2. *Karantakis P., Helvatjoglou-Antoniades M., Theodoridou-Pahini S., Papadogiannis Y.*: Fluoride release from three glass ionomers, a compomer, and a composite resin in water, artificial saliva, and lactic acid. *Oper. Dent.* 2000, 25, 20–25.
3. *Pluciennik M.*: Działanie fluoru uwalnianego z materiałów do wypełnień stałych. *Mag. Stom.* 2003, 3, 74–77.
4. *Abu-Bakr N.H. et al.*: Effect of alcoholic and low-pH soft drinks on fluoride release from compomer. *J. Esthet. Dent.* 2000, 12, 2, 97–104.
5. *Attin T., Buchalla W., Siewert C., Hellwig E.*: Fluoride release/uptake of polyacid-modified composite resin (compomers) in neutral and acidic buffer solutions. *J. Oral. Rehabil.* 1999, 26, 388–393.
6. *Garcia-Godoy F., Abarzua I., de Goes M.F., Chan D.C.*: Fluoride release from fissure sealants. *J. Clin. Pediatr. Dent.* 1997, 22, 2, 45–49.
7. *Grobler S.R., Rossouw R.J., Van Wyk Kotze T.J.*: A comparison of fluoride release from various dental materials. *J. Dent.* 1998, 26, 3, 259–265.
8. *Horsted-Bindslev P.*: Fluoride release from alternative restorative materials. *J. Dent.* 1994, 22, Suppl. 1, 37–40.
9. *Preston A.J. et al.*: Fluoride release from aesthetic dental materials. *J. Oral. Rehabil.* 1999, 26, 123–129.
10. *Jodkowska E., Wagner L.*: Uwalnianie jonów fluorkowych z uszczelniający. *Stom. Współ.*, 1997, 4, 268–271.
11. *Jodkowska E., Wagner L.*: Długoterminowe uwalnianie jonów fluorkowych z uszczelniający zawierających różne związki fluoru do 0,01 M roztworu NaCl. *Stom. Współ.* 1998, 5, 21–23.
12. *Morphis T.L., Toumba K.L., Lygidakis N.A.*: Fluoride pit and fissure sealants: A review. *Int. J. Pediatr. Dent.* 2000, 10, 2, 90–98.
13. *Rock W.P., Foulkes E.E., Perry H., Smith A.J.*: A comparative study of fluoride-releasing composite resin and glass ionomer materials used as fissure sealants. *J. Dent.* 1996, 275–280.
14. *Burke F.M., Rav N.J., McConnell R.J.*: Fluoride-containing restorative materials. *Int. Dent. J.* 2006, 56, 1, 33–43.
15. *Lobo M.M., Pecharki G.D., Tengan C., da Silva D.D., da Tagliaferro E.P., Napimoga M.H.*: Fluoride-releasing capacity and cariostatic effect provided by sealants. *J. Oral Sci.* 2005, 47, 1, 35–41.
16. *Hicks M.J., Flaitz C.M., Garcia-Godoy F.*: Fluoride-releasing sealant and caries-like enamel lesion formation in vitro. *J. Clin. Pediatr. Dent.* 2000, 24, 3, 215–219.
17. *Rajtboriraks D., Nakornchai S., Bunditsing P., Surarit R., Iemjarern P.*: Plaque and saliva fluoride levels after placement of fluoride releasing pit and fissure sealants. *Pediatr. Dent.* 2004, 26, 1, 63–66.
18. *Koga H., Kameyama A., Matsukubo T., Hirai Y., Takaesu Y.*: Comparison of short-term in vitro fluoride release and recharge from four different types of pit-and-fissure sealants. *Bull. Tokyo Dent. Coll.* 2004, 173–179.

ANNA LUBKOWSKA, DARIUSZ CHLUBEK¹, ANNA MACHOY-MOKRZYŃSKA²

**WPLYW NAPRZEMIENNEGO PODAWANIA CHLORKU GLINU
I FLUORKU SODU W WODZIE PITNEJ NA STĘŻENIE FLUORKÓW
W SUROWICY I ICH KUMULACJĘ W KOŚCIACH SZCZURÓW**

**THE EFFECT OF ALTERNATING ADMINISTRATION OF ALUMINUM CHLORIDE
AND SODIUM FLUORIDE IN DRINKING WATER ON THE CONCENTRATION
OF FLUORIDE IN SERUM AND ITS CONTENT IN BONES OF RATS**

Zakład Fizjologii Zwierząt, Katedra Fizjologii
Wydział Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Szczecińskiego
al. Piastów 40b, 71-065 Szczecin

Kierownik: dr hab., prof. US *Maria Brzezińska*

¹ Zakład Biochemii, Katedra Biochemii i Chemii Medycznej Pomorskiej Akademii Medycznej
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin

Kierownik: prof. dr hab. n. med. *Dariusz Chlubek*

² Katedra Farmakologii Pomorskiej Akademii Medycznej
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin

Kierownik: prof. dr hab. n. med. *Marek Drożdżik*

Summary

Introduction: Fluorine and aluminum remain a very interesting research topic due to equivocal and relatively unknown toxic action, role in the etiology of various diseases, and interactions of both elements. Fluorine and aluminum compounds are absorbed by organisms through the gastric and respiratory systems, although the latter route operates only at very high concentrations in air. Chronic exposure to fluorine and aluminum leads to accumulation of both elements, especially in bones and teeth, but also in lung, brain, kidney, and liver. Organisms excrete these elements with urine, faeces, and to a minor extent with sweat and bile.

Material and methods: In the light of reports suggesting that aluminum has protective properties against fluorine toxicity during exposure to both elements, we decided to examine the effect of alternating doses of aluminum fluoride and sodium fluoride in drinking water on rats. Four female groups received: I – 100 ppm fluorine ions during one month; II – 100 ppm fluorine ions alternating every two days with 300 ppm aluminum ions during one month; III – 100 ppm fluoride ions during four months; IV – 100 ppm fluorine ions alternating every two days with 300 ppm aluminum ions

during four months. The respective male groups called IA, IIA, IIIA, and IVA were treated identically. Subsequently, the animals were anesthetized and sacrificed. Blood was sampled from the heart and the right femur was removed for fluorine determination. Fluorine content in the femur and serum was determined with an ion-selective electrode (Orion). The results were analyzed statistically (Statistica 6).

Conclusions: We observed higher fluoride concentrations in serum as compared with control values in all groups of female and male rats exposed to sodium fluoride only. Longer exposure time (4 months) did not result in further increase in serum fluoride concentration. However, longer exposure increased fluoride accumulation in the femur ($p < 0.001$). All groups exposed to NaF had significantly higher fluoride concentration in the femur as compared with control animals. Groups receiving NaF and $AlCl_3$ showed lower fluoride concentration in serum and femur compared with those exposed to NaF only and higher in comparison with controls. Fluorine content in the femur of rats exposed to NaF and $AlCl_3$ for four months was similar to the results obtained after one month of exposure.

Key words: fluorine – aluminum – rats.

Streszczenie

Wstęp: Fluor i glin wciąż budzą zainteresowanie ze względu na niejednoznaczny i nie w pełni poznany charakter ich toksyczności, udział w etiopatogenezie wielu schorzeń, a także z powodu możliwości występowania oddziaływań pomiędzy nimi. Związki chemiczne tworzone przez oba te pierwiastki przyswajane są przez organizmy drogą pokarmową lub wziewną, choć przez płuca przedostają się głównie w przypadkach znacznych stężeń w powietrzu, związanych z narażeniem zawodowym. Długotrwałe narażenie na fluor i glin prowadzi do ich kumulacji, głównie w kościach i zębach, ale także w płucach, mózgu, nerkach i wątrobie. Procesowi temu przeciwdziała względnie sprawne wydalanie z moczem, a także z kałem i potem.

Material i metody: W związku z doniesieniami o możliwości protekcyjnego działania glinu wobec toksyczności fluoru w przypadku jednoczesnej ekspozycji na oba te pierwiastki, podjęto badania, których celem była ocena wpływu naprzemiennego podawania szczurom w wodzie pitnej chlorku glinu (AlCl_3) i fluorku sodu (NaF) wg następującego schematu: grupa I – samice: 100 ppm jonu fluorkowego przez 1 miesiąc; grupa II – samice: naprzemiennie, co dwa dni fluorek w dawce 100 ppm i glin w dawce 300 ppm przez 1 miesiąc; grupa III – samice: 100 ppm jonu fluorkowego przez 4 miesiące; grupa IV – samice: naprzemiennie, co dwa dni fluorek w dawce 100 ppm i glin w dawce 300 ppm przez 4 miesiące. Grupy IA, IIA, IIIA i IVA stanowiły samce otrzymujące fluorek lub naprzemiennie fluorek i glin w dawkach podanych wyżej. Odpowiednie grupy kontrolne pojęte były wodą destylowaną *ad libitum*. Po upływie założonego czasu doświadczenia zwierzęta uśmiercano w znieczuleniu ogólnym, pobierano krew bezpośrednio z serca i wypreparowywano kości udowe prawe. W pozyskanej surowicy krwi i w kościach oznaczano stężenie fluorków metodą potencjometryczną, przy użyciu fluorkowej elektrody jonoselektywnej firmy Orion. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej (program Statistica 6).

Wnioski: We wszystkich grupach samic i samców, eksponowanych wyłącznie na NaF (I, IA, III i IIIA), stwierdzono większe stężenia fluorków w surowicy w porównaniu z kontrolą, przy czym wydłużanie ekspozycji z 1 do 4 miesięcy nie powodowało statystycznie istotnego wzrostu stężenia fluorków w badanych surowicach. Podawanie zwierzętom wyłącznie NaF przez 4 miesiące skutkowało natomiast statystycznie istotnym zwiększeniem kumulacji fluorków w kościach udowych w porównaniu do grup eksponowanych przez 1 miesiąc ($p \leq 0,001$). Wszystkie grupy eksponowane wyłącznie na NaF wykazywały istotnie większe stężenia fluorków w kościach w porównaniu z kontrolą. W grupach, którym podawano NaF i AlCl_3 naprzemiennie, stężenia fluorków w surowicy i kościach były istotnie mniejsze w porównaniu z eksponowanymi wyłącznie na NaF , ale większe w porównaniu z kontrolą. Stężenia fluorków

w kościach po 4-miesięcznym narażeniu na oba pierwiastki były zbliżone do wartości obserwowanych po miesięcznej ekspozycji wyłącznie na NaF .

H a s ł a: fluor – glin – szczury.

Wstęp

Badania nad metabolizmem fluoru i jego oddziaływaniem na organizmy żywe są zaawansowane i prowadzone w różnych aspektach. Potwierdzone w literaturze niebezpieczeństwo, jakie niesie ze sobą przedłużająca się ekspozycja na fluor przyswajany drogą pokarmową i wziewną, jest ściśle związane z jego wpływem na aktywność enzymów, prowadzącym do zaburzeń procesów glikolizy, cyklu Krebsa, wytwarzania ATP oraz syntezy białek i DNA. Badania dotyczące udziału jonów fluorkowych w metabolizmie komórki wskazują na ich duże znaczenie w odniesieniu do procesów oksydoredukcyjnych i aktywności enzymów antyoksydacyjnych, niektórych enzymów łańcucha oddechowego, a także procesów peroksydacji lipidów [1, 2]. Choć fluor bywa zaliczany do pierwiastków śladowych, niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania niektórych tkanek i narządów, to pamiętać należy, iż charakteryzuje się bardzo wąskim marginesem bezpieczeństwa pomiędzy dawką pożądaną i toksyczną [3, 4].

Niezmiernie ważnym nurtem badań nad fluorem jest poszukiwanie jego ewentualnych interakcji z ksenobiotykami. Jak wiadomo biodostępność, przyswajanie, a także toksyczność pierwiastków zależy od wielu czynników związanych z ich ilością i formą chemiczną w jakiej występują w środowisku naturalnym, dietą i indywidualnymi cechami organizmów. Nie można jednak w pełni ocenić znaczenia i funkcji poszczególnych pierwiastków bez znajomości ich wzajemnych oddziaływań, wynikających z podobieństwa w budowie, sąsiedztwa w układzie okresowym lub powinowactwa do tych samych przENOŚNIKÓW czy tkanek [5].

Interakcje fluoru i glinu budzą ostatnio coraz większe zainteresowanie i wywołują kontrowersje m.in. w związku z doniesieniami na temat ich roli w etiologii choroby Alzheimera [6, 7, 8, 9]. Jednocześnie warto zaznaczyć, że oba te pierwiastki uważane były kiedyś za nietoksyczne. W środowisku biologicznym glin tworzy głównie trwałe związki kompleksowe, wykazując silny ładunek dodatni i właściwości elektronoakceptorowe. Wiadomo obecnie, że jony Al^{3+} są czynnikiem kompleksującym ligandy wewnątrzkomórkowe [10, 11]. Pojawienie się w diecie związków obniżających pH wpływa dodatnio na biodostępność glinu przez powstanie rozpuszczalnych związków glinu lub też przez bezpośredni wpływ na proces absorpcji [12].

Celem podjętych badań była ocena wpływu naprzemiennego podawania szczurom w wodzie pitnej chlorku glinu i fluorku sodu przez 1 lub 4 miesiące na stężenie fluorków w surowicy krwi i kościach udowych.

Material i metody

Badania przeprowadzono na 97 szczurach obu płci rasy Wistar, o początkowej masie ciała równej 205–305 g (\bar{x} = 255 g) i 245–425 g (\bar{x} = 335 g), odpowiednio dla samic i samców. Przed rozpoczęciem eksperymentu szczury poddano miesięcznej adaptacji. Zwierzęta żywiono standardową paszą LSM (granulowana mieszanka dla myszy i szczurów ze śladową zawartością fluoru i glinu). Poszczególne grupy zwierząt otrzymywały w wodzie pitnej: grupa I – samice: 100 ppm jonu fluorowego przez 1 miesiąc; grupa II – samice: naprzemiennie, co dwa dni fluorek w dawce 100 ppm i glin w dawce 300 ppm przez 1 miesiąc; grupa III – samice: 100 ppm jonu fluorowego przez 4 miesiące; grupa IV – samice: naprzemiennie, co dwa dni fluorek w dawce 100 ppm i glin w dawce 300 ppm przez 4 miesiące. Grupy IA, IIA, IIIA i IVA stanowiły samce otrzymujące fluorek lub naprzemiennie fluorek i glin w dawkach podanych wyżej. Zwierzęta kontrolne (K_1 , K_2 , K_3 i K_4) pojono wodą destylowaną *ad libitum*. Po upływie założonego czasu eksperymentu zwierzęta uśmiercano w znieczuleniu ogólnym z zastosowaniem chlorowodoru ketaminy. W celu oznaczenia stężeń fluorków pobierano krew bezpośrednio z serca oraz wypreparowywano kości udowe prawe. Poprzez odwirowanie krwi przez 10 min w temp. 4°C, przy 2800 g pozyskiwano surowicę, którą zamrażano do czasu wykonania analiz. Bezpośrednio przed wykonaniem oznaczeń surowicę rozcieńczano buforem TISAB III. Kości udowe oczyszczano z tkanek miękkich, trzykrotnie wygotowywano w wodzie destylowanej, suszono w temperaturze 105°C i rozdrabniano mechanicznie w móżdżerku agatowym. Jednorodny proszek odłuszczano acetonem i suszono ponownie. Próbkę do pomiaru stężeń fluorków w kościach, w ilości ok. 20 mg zalewano 1 mL kwasu nadchlorowego o stężeniu 2 mol/L. Po rozpuszczeniu do próbki dodawano cytrynianu trisodowego i buforu TISAB II. W tak przygotowanym materiale oznaczano zawartość fluorków metodą potencjometryczną przy użyciu fluorowej elektrody jonoselektywnej firmy Orion. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej (program Statistica 6).

Wyniki

W tabelach 1 i 2 przedstawiono wartości średnie, odchylenia standardowe, wartości minimalne i maksymalne oraz istotności różnic stężeń fluorków w surowicy i kościach udowych zwierząt w poszczególnych grupach. We wszystkich grupach samic i samców, eksponowanych wyłącznie na fluorek sodu – NaF (I, IA, III i IIIA), stwierdzono większe stężenia fluorków w surowicy w porównaniu z kontrolą, przy czym wydłużanie ekspozycji z 1 do 4 miesięcy nie powodowało statystycznie istotnego wzrostu stężenia fluorków w badanych surowicach. Świadczyć to może o uruchamianiu przez organizm mechanizmów adaptacyjnych i obronnych, przeciwstawiających się niekontrolowanemu wzrostowi stężenia fluorków we krwi, a wraz z nią ich niebezpiecznej dystrybucji do tkanek. Jednym z tych mechanizmów może

Tabela 1. Średnie stężenia fluorków w surowicy badanych szczurów

Table 1. Mean fluoride concentration in rat serum

Grupa Group	n	Stężenie fluorków w surowicy (µg/mL) Serum fluoride concentration (µg/mL)			
		\bar{x}	SD	min.	max
I	10	0,35 ** K_1 , ***II	0,10	0,24	0,52
IA	10	0,29 * K_2 , *IIA	0,15	0,16	0,56
II	9	0,16 ** K_1 , ***I	0,02	0,13	0,19
IIA	10	0,17 *IA	0,06	0,11	0,29
K_1	5	0,11 **I, II	0,01	0,08	0,13
K_2	5	0,14 *IA	0,08	0,08	0,29
III	10	0,38 ** K_3 , ***IV	0,09	0,22	0,50
IIIA	10	0,37 ** K_4 , ***IVA	0,11	0,23	0,58
IV	9	0,14 ***III	0,03	0,11	0,21
IVA	11	0,17 ** K_4 , ***III	0,05	0,12	0,30
K_3	5	0,14 * K_4 , **III	0,02	0,11	0,17
K_4	5	0,09 * K_3 , **IIIA, IVA	0,02	0,05	0,13

n – liczba badanych zwierząt / number of animals; \bar{x} – średnia arytmetyczna / arithmetic mean; SD – odchylenie standardowe / standard deviation

* różnice istotne na poziomie $p < 0,05$ / significance of differences at $p \leq 0,05$

** różnice istotne na poziomie $p \leq 0,01$ / significance of differences at $p \leq 0,01$

*** różnice istotne na poziomie $p \leq 0,001$ / significance of differences at $p \leq 0,001$

być pobieranie nadmiaru fluorków z krwi przez szkielet i kumulowanie ich w formie fluorohydroksyapatytu, fluoroapatytu i fluorku magnezu [3]. Potwierdzają to badania własne. Wydłużenie do 4 miesięcy czasu ekspozycji wyłącznie na NaF (grupy III i IIIA) spowodowało statystycznie istotne zwiększenie stężenia fluorków w kościach udowych w porównaniu z grupami eksponowanymi przez 1 miesiąc (grupy I i IA) ($p \leq 0,001$). Zgodnie z oczekiwaniami, wszystkie eksponowane grupy wykazywały istotnie większe stężenia fluorków w kościach w porównaniu do kontroli.

Nieco inaczej przedstawiała się dystrybucja fluorków do kości i ich stężenia w surowicy zwierząt, którym NaF podawano naprzemiennie z chlorkiem glinu – $AlCl_3$. We wszystkich tych grupach (II, IIA, IV i IVA) stężenia fluorków w surowicy i kościach były statystycznie istotnie mniejsze w porównaniu do grup eksponowanych wyłącznie na NaF, ale większe w porównaniu z kontrolą. Stężenia fluorków w kościach, po ekspozycji na oba pierwiastki trwają-

Tabela 2. Średnie stężenia fluorków w kościach udowych badanych szczurów

Table 2. Mean fluoride concentration in rat femur

Grupa Group	n	Stężenie fluorków w kościach udowych (µg/g) Concentration of fluoride in femur (µg/g)			
		\bar{x}	SD	min.	max
I	10	1308,10 *K ₁ , **II, III	175,99	975,45	1540,21
IA	10	1309,20 *IIA, *K ₂ , **IIIA	175,42	1046,83	1655,21
II	10	838,58 *K ₁ , **I, IV	82,15	732,11	981,18
IIA	10	953,21 *IA, IVA, K ₂	195,63	774,32	1440,20
K ₁	5	292,04 *I, II	14,50	270,56	306,14
K ₂	5	263,36 *IA, IIA	18,64	235,53	282,87
III	7	2525,44 *K ₃ , **IV, I	331,13	2137,50	3224,54
IIIA	10	2444,52 *K ₄ , **IVA, IA	482,24	1823,23	3209,12
IV	9	1302,53 **III, II	106,83	1127,37	1410,78
IVA	11	1270,82 *IIA, *K ₄ , **IIIA	140,64	997,40	1512,53
K ₃	5	329,17 *III	30,86	286,94	371,86
K ₄	5	303,84 *IIIA, IVA	13,69	289,09	318,41

n – liczba badanych zwierząt / number of animals; \bar{x} – średnia arytmetyczna / arithmetic mean; SD – odchylenie standardowe / standard deviation;

* różnice istotne na poziomie $p \leq 0,01$ / significance of differences at $p \leq 0.01$

** różnice istotne na poziomie $p \leq 0,001$ / significance of differences at $p \leq 0.001$

cej 4 miesiące, były zbliżone do wartości obserwowanych w grupach eksponowanych przez 1 miesiąc wyłącznie na NaF. Należy zaznaczyć, iż w związku z naprzemiennym podawaniem NaF i AlCl₃ czas ekspozycji tych grup wydłużono do momentu przyjęcia przez zwierzęta porównywalnych dawek fluorków z grupami otrzymującymi wyłącznie NaF. Wyniki wskazują więc na to, iż podawanie glinu wpłynęło ograniczająco na przyswajalność i dystrybucję fluorków do kości.

Prace na temat interakcji fluorków i glinu na etapie wchłaniania w przewodzie pokarmowym, które prowadzą do modyfikacji efektów toksycznych i działań pożądaných, pojawiły się m.in. w związku z badaniami etiologii choroby Alzheimera [13, 14, 15, 16]. Biodostępność pierwiastków uzależniona jest w znacznym stopniu od formy chemicznej, w jakiej występują w przewodzie pokarmowym, co wiąże się z kolei z naturą ligandów tworzących z tymi pierwiastkami połączenia w soku żołądkowym lub jelitowym. Pojawienie się w diecie związków obniżających pH wpływa dodatnio na biodostępność glinu w dwojaki

sposób: poprzez powstawanie rozpuszczalnych związków glinu lub bezpośrednio przez wpływ na proces absorpcji [17]. *Glynn i wsp.*, oceniając wpływ cytrynianu, fluorku i krzemianu na absorpcję glinu u szczurów, stwierdzili, że cytrynian i fluorek umożliwiają tworzenie rozpuszczalnych kompleksów cytrynianu glinu (97%) i fluorku glinu (60%), przy czym jedynie cytrynian miał wpływ na absorpcję glinu [18]. Wcześniejsze badania *Allaina i wsp.* [19] oraz *Spencera i wsp.* [20] wykazały, że fluor podawany równocześnie z glinem powoduje wzrost stężenia glinu w osoczu, stymulując jego absorpcję w stopniu porównywalnym z cytrynianem. Jednocześnie stwierdzono, że glin hamuje wchłanianie fluorków. Obecność w przewodzie pokarmowym związków tworzących kompleksy z glinem powoduje rozpad form polimerycznych i gwałtowny wzrost przyswajania glinu przez komórki śluzówki przewodu pokarmowego [10]. Przeprowadzone przez *Varnera i wsp.* doświadczenia, w których szczury otrzymywały w wodzie pitnej 0,5 ppm, 5 ppm i 50 ppm AlF₃ przez 45 tygodni, zwróciły uwagę na większą zachorowalność i śmiertelność zwierząt w grupie eksponowanej na najmniejsze stężenie AlF₃ [21]. Przypuszczalnym powodem takiej sytuacji mogło być to, iż fluor był głównym czynnikiem toksycznym, a efekty przez niego wywołane zostały zredukowane przez oddziaływanie glinu w grupach otrzymujących większe dawki AlF₃. Opierając się na doniesieniach epidemiologicznych o ochronnym wpływie fluorków wobec biotoksyczności glinu, możliwe jest także, że ilość fluorków związanej w kompleks z glinem w grupie otrzymującej najniższe dawki AlF₃ była niedostateczna dla ujawnienia działania protekcyjnego wobec glinu w porównaniu z grupą otrzymującą większą dawkę AlF₃.

Ahn i wsp. oceniali wpływ podawania różnych dawek glinu i fluorków w wodzie pitnej, osobno i w kombinacjach, na ich przyswajanie i kumulację w siekaczach, kości piszczelowej i mostku królików. Na podstawie uzyskanych przez nich wyników potwierdzono ujemny wpływ glinu na absorpcję fluorków oraz wykazano, że podawanie królikom 20 ppm fluorków przez okres 10 tygodni sprzyja kumulacji glinu w tkance kostnej [22].

Wnioski

1. Ekspozycja szczurów na fluor w wodzie pitnej powoduje wzrost stężenia tego pierwiastka w surowicy i kumulację w kościach zależną od czasu trwania narażenia.

2. Glin podawany naprzemiennie z fluorkami ogranicza prawdopodobnie jego przyswajalność, zmniejszając tym samym stężenia fluorków zarówno w surowicy, jak i kościach.

Piśmiennictwo

1. *Chlubek D.*: Fluoride and oxidative stress. *Fluoride*, 2003, 36, 217–228.

2. *Chinoy N.J., Patel T.N.*: The influence of fluoride and/or aluminum on free radical toxicity in the brain of female and beneficial affects of some antidotes. *Fluoride*, 2000, 33, 58.
3. *Pawłowska-Góral K., Wardas W., Wardas M., Kusa Z.*: Wpływ związków fluoru na organizm człowieka. *Ann. Acad. Med. Siles.* 1998, 34–35, 105–119.
4. *Pieróg B., Socha M.*: Pozytywne i negatywne oddziaływanie fluoru na organizm człowieka. *Źródła fluoru w środowisku. Med. Pr.* 2000, 51, 75–78.
5. *Witkowska J., Czerwińska D., Kiepuski A., Roszkowski W.*: Pierwiastki szkodliwe a żelazo, cynk i miedź: interakcje w organizmie zwierząt i ludzi. Cz. I. Rtęć, cyna, nikiel, selen, fluor, glin. *Rocz. Państw. Zakł. Hig.* 1991, 42, 15–23.
6. *De Voto E., Yokel R.A.*: The biological speciation and toxicokinetics of aluminum. *Environ. Health. Perspect.* 1994, 102, 940–951.
7. *Forbes W.F., Agwani N.*: A suggested mechanism for aluminum bio-toxicity. *J. Theor. Biol.* 1994, 171, 207–214.
8. *Forbes W.F., Hayward L.M., Agwani N.*: Dementia, aluminium, and fluoride. *Lancet*, 1991, 338, 1592–1593.
9. *Strunecka A., Patocka J.*: Pharmacological and toxicological effects of aluminofluoride complexes. *Fluoride*, 1999, 32, 230–242.
10. *Graczyk A., Długaszek M.*: Procesy biochemiczne i mechanizmy molekularne toksyczności glinu. *Roczn. Państw. Zakł. Hig.* 1993, 44, 23–42.
11. *Umbreit M.H.*: Nowe spojrzenie na właściwości biologiczne jonów glinu. *Farm. Pol.* 1993, 49, 1–5.
12. *Ochmański W., Barabasz W.*: Glin – występowanie i toksyczność dla organizmów. *Przegl. Lek.* 2000, 57, 665–668.
13. *Campbell A.*: The potential role of aluminum in Alzheimer's disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002, 17, Suppl. 2, 17–20.
14. *Exley C., Korchazhkina O.*: The association of aluminum and β -amyloid in Alzheimer's disease. *Aluminum and Alzheimer's disease. The science that describes the link.* Elsevier Science B.V. 2001.
15. *Flaten T.P.*: Aluminum as a risk factor in Alzheimer's disease, with emphasis on drinking water. *Brain Res. Bull.* 2001, 55, 187–196.
16. *Gauthier E., Fortier I., Courchesne F., Pepin P., Mortimer J., Gauvreau D.*: Aluminum forms in drinking water and risk of Alzheimer's disease. *Environ. Res.* 2000, 84.
17. *Desroches S., Dayde S., Berthon G.*: Aluminum speciation studies in biological fluids. Part 6. Quantitative investigation of aluminum(III)-tartrate complex equilibria and their potential implications for aluminum metabolism and toxicity. *J. Inorg. Biochem.* 2000, 81, 301–312.
18. *Glynn A.W., Sparen A., Danielsson L.G., Sundstrom B., Jorhem L.*: The influence of complexing agents on the solubility and absorption of aluminum in rats exposed to aluminum in water. *Food Addit. Contam.* 2001, 18, 515–523.
19. *Allain P., Gauchard F., Krari N.*: Enhancement of aluminum digestive absorption by fluoride in rats. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 1996, 91, 225–231.
20. *Spencer H., Kramer L., Norris C., Wiatrowski E.*: Effect of aluminum hydroxide on fluoride metabolism. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1980, 28, 529–535.
21. *Varner J.A., Jensen K.F., Horvath W., Isaacson R.L.*: Chronic administration of aluminum-fluoride or sodium-fluoride to rats in drinking water: alternations in neuronal and cerebrovascular integrity. *Brain Res.* 1998, 784, 284–298.
22. *Ahn H., Fulton B., Moxon D., Jeffery E.H.*: Intractive effects of fluoride and aluminum uptake and accumulation in bones of rabbits administered both agents in their drinking water. *J. Toxicol. Environ. Health A*, 1995, 44, 337–350.

ANNA MACHOY-MOKRZYŃSKA, ZYGMUNT MACHOY¹

AKTUALNE KIERUNKI BADAŃ NAD FLUOREM

CURRENT TRENDS IN FLUORINE RESEARCH

Katedra Farmakologii Pomorskiej Akademii Medycznej
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin

Kierownik: prof. dr hab. n. med. *Marek Drożdżik*

¹ Katedra Biochemii i Chemii Medycznej Pomorskiej Akademii Medycznej
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin

Kierownik: prof. dr hab. n. med. *Dariusz Chlubek*

Summary

Purpose: Current topics in fluorine research are presented with emphasis on findings by researchers in Szczecin and Poland, as well as in the world. Reports are cited on the distribution of fluorine compounds in the environment, routes of penetration into living organisms, and analytical methods for the quantitative determinations of fluorine content in air, water, soil, and foods.

Important contributions have been made by Polish researchers on the role and patterns of fluorides in body fluids, soft and hard tissues, which remain in direct relationship to accumulation and elimination of fluorine. So far, comprehensive studies on mutagenic effects of fluorine and its potential role in bone neoplasms, Down syndrome, and other genetic disorders have not been carried out in Poland. Worthy of mention are reports on mechanisms of action of fluorine compounds on the cellular and subcellular level.

Conclusions: Finally, two achievements of recent years in the field of fluorine research are discussed briefly. The first is concerned with the use in dentistry of chemical analysis for studying mineral reconstruction of teeth throughout the lifetime of an individual. The second is in the field of medicine where molecular modeling has been applied to explain the mechanism of action of aluminofluoride complexes (AlF_x) as a messenger of false information during protein biosynthesis and their apparent role in the etiology of Alzheimer's disease.

K e y w o r d s: fluoride – dentistry – molecular modeling.

Streszczenie

Wstęp: W pracy przedstawiono aktualne kierunki badań nad fluorem, z podkreśleniem wyników uzyskanych w Szczecinie i w Polsce na tle osiągnięć światowych. Cytowano kolejno wybrane publikacje na temat obecności związków fluoru w środowisku przyrodniczym, dróg wnikania do organizmów żywych i metod analitycznych, pozwalających na ilościowe oznaczanie zawartości fluoru w powietrzu, wodzie, glebie i żywności.

Znaczący jest udział polskich badaczy w ocenie roli i zachowania się fluorków w płynach ustrojowych, tkankach miękkich i twardych, co ma bezpośredni związek z możliwością ich kumulacji i eliminacji. Do chwili obecnej nie podjęto w Polsce kompleksowych badań związanych z działaniem mutagennym fluoru, jego potencjalnym związkiem z nowotworami kości, z występowaniem zespołu Downa czy innych zaburzeń na tle genetycznym. Na podkreślenie zasługują doniesienia naukowe dotyczące mechanizmów działania związków fluoru na poziomie komórkowym i subkomórkowym.

Wnioski: Zasygnalizowano dwa osiągnięcia ostatnich lat związane z problematyką fluorową. Jednym z nich jest wykorzystanie w stomatologii analizy chemicznej do oceny przebudowy mineralnej zębów w ciągu życia osobniczego. Drugim – z zakresu medycyny – możliwość zastosowania modelowania molekularnego do wyjaśnienia mechanizmu wpływu kompleksów glinowo-fluorkowych (AlF_x) na przekazywanie fałszywych informacji w biosyntezie białka, co może mieć związek np. z etiologią choroby Alzheimera.

H a s ł a: fluorki – stomatologia – modelowanie molekularne.

*

Od momentu stwierdzenia, że fluor jest biopierwiastkiem nastąpiła intensyfikacja badań nad jego rolą biologiczną, możliwością zastosowania w praktyce oraz toksycznością. Początkowo analizowano źródła fluoru w środowisku (powietrze, woda, gleba) oraz drogi jego wnikania do organizmów: u roślin z atmosfery oraz poprzez przyswajanie stosowanych fluorowanych pestycydów i herbicydów, a u zwierząt i ludzi przez układ oddechowy, układ pokarmowy oraz przez skórę i jej przydatki [1].

Problematyce tej poświęcono cykl dwunastu krajowych sympozjów fluorowych i jednej konferencji światowej, które organizowano w Szczecinie od lat 80. ubiegłego stulecia. Wówczas podstawowym problemem okazały się zagadnienia analityczne związane z oznaczaniem związków fluoru [2]. Pierwszą czynnością jest przygotowanie materiału do analitycznego oznaczenia zawartości fluorków [3]. Spośród stosowanych różnych metod najdogodniejszą okazała się chromatografia gazowa [4] oraz metoda potencjometryczna z wykorzystaniem elektrody jonoselektywnej [5], rzadziej metody kolorymetryczne, jako mniej dokładne. Minimalna ilość badanego materiału i wysoka czułość elektrody fluorkowej pozwoliły *Lagockiej* na opracowanie w roku 2000 metody tzw. biopsji kwasowej, która dała nowe możliwości oznaczania fluorków w stomatologii w badaniach *in vitro* i *in vivo* [6]. Jest to ważne uzupełnienie systematycznie publikowanych od 1980 roku w kwartalniku „Fluoride” doniesień *Wang C.Y.* i *Xu J.* na temat rozwoju analizy fluorków [7].

Prowadząc badania nad praktycznym zastosowaniem fluorków, pamiętać należy, że są one substancjami toksycznymi. *Miller*, jeden z liderów Światowego Towarzystwa Badań nad Fluorkami (*International Society for Fluoride Research – ISFR*) stwierdził, że wśród lekarzy i stomatologów często ignorowany jest fakt, że fluorki wykazują również działanie toksyczne [8]. Wielu polskich badaczy podjęło ten problem, analizując go w licznych publikacjach dotyczących toksyczności prenatalnej fluorków [9], jego bioprzyswajalności (zwłaszcza z żywności) [10, 11], sposobów redukcji zawartości fluorków w organizmie przez dobór odpowiedniej diety [12] oraz przypadków ostrych śmiertelnych zatruc związkami fluoru [13], w tym także w celach samobójczych [14]. Opisano związki łagodzące skutki nietolerancji wobec fluorków [15] oraz mechanizmy ich eliminacji i możliwości detoksykacji w organizmach żywych [16, 17, 18]. Ocena pobierania fluorków, ich kumulacji i wydalania pozwoliła na ustalenie bilansu fluorkowego organizmu.

Do chwili obecnej ukazały się tysiące prac na temat oddziaływania i zawartości fluoru w płynach ustrojowych (krew [19, 20], mocz [21, 22], ślina [23], płyn mózgowo-rdzeniowy), w tkankach miękkich [24] (nerki, wątroba, mózg, łożysko [25]), w tkankach twardych (kość, zęby [26], paznokcie [27, 28], włosy [29], sierść, racice [30], poroża

[31], kamienie moczowe [32], muszle [33], skorupy jaj [34]). Tkanki twarde, przez wiązanie fluorków, stanowią ważny czynnik detoksykacyjny w ustroju zwierząt i ludzi [17]. Prowadząc badania, szukano odpowiedzi na pytanie, kiedy fluorki wykazują oddziaływanie pozytywne. Należą do nich fluorowane leki [35], profilaktyka fluorkowa w stomatologii [26], aktywacja wybranych enzymów [36], stymulacja rozwoju niektórych roślin [37]. Okazało się równocześnie, że więcej jest wpływów negatywnych fluorków. Są to m.in.: hamowanie wegetacji roślin [38], ostra i przewlekła toksyczność [13], możliwość powstawania fluorozębowej [39] i szkieletowej [40] oraz liczne zaburzenia metaboliczne, takie jak cukrzyca fluorowa [41], osteoporoza [42] czy zaburzenia syntezy kolagenu [43]. Fluorki mogą również hamować aktywność niektórych enzymów [36], wpływać na procesy bioenergetyczne [44] oraz oddychanie tkankowe [45], przyspieszać procesy starzenia [46] i oddziaływać na reprodukcję zwierząt hodowlanych [47]. Podane przykłady nie wyczerpują możliwości negatywnego oddziaływania związków fluoru. Mogą to być również zagadnienia związane z działaniem mutagennym, związkiem z nowotworami kości, występowaniem zespołu Downa czy aberracji chromosomalnych [48]. Te ostatnie problemy nie były badane w Polsce.

W książce pt. „Pierwiastki śladowe w środowisku biologicznym” *Kabata-Pendias* i *Pendias* zwracają uwagę na udział wielu pierwiastków w budowie substancji biologicznych, w cyklach i procesach biogeochemicznych oraz wpływie na równowagę chemiczną w środowisku biologicznym, a także roli fizjologicznej pierwiastków w organizmach roślinnych i zwierzęcych [49]. Podczas sympozjów fluorowych w Szczecinie najczęściej przedstawianym problemem były interakcje pomiędzy fluorem a metalami [50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58], w szczególności metalami ciężkimi [59, 60, 61], występującymi w osoczu, moczu i innych płynach i tkankach.

Przedstawiono również zagadnienia o znaczeniu ogólnym, analizujące biochemiczne mechanizmy działania związków fluoru. Należą do nich opisane m.in. odmienne mechanizmy wiązania fluorków przez kość i ząb [62], mechanizm powstawania fluorozębowej [39], wpływ fluorków na gospodarkę energetyczną [44], na wybrane enzymy [36] – zwłaszcza oddechowe [63] – oraz na aktywność enzymów w badaniach *in vivo* i *in vitro* [64]. Przedstawienie przebiegu krążenia fluoru w jamie ustnej jest szczególnie ciekawe, gdyż ślina jest dostarczycielem wielu innych substancji, nie tylko fluorków, odgrywających rolę w procesach mineralizacji zębów [65]. Dla medycyny praktycznej ważne są też opracowania kompleksowe, oceniające stan zdrowia i rozwój dzieci z rejonów o podwyższonej obecności fluoru w porównaniu z terenami kontrolnymi [66].

Na tle przedstawionych zagadnień zbyt mało jeszcze wiemy o roli i znaczeniu fluoru w chemii leków [67]. Od dawna znane są wiadomości na temat roli biologicznej fluorowanych nukleotydów i nukleozydów. Wykorzystywane są fluorowane pochodne związków o znaczeniu terapeutycznym [35, 68],

np. leków przeciwbakteryjnych (chinolony), przeciwgrzybiczych (azole), preparatów o silnym działaniu przeciwzapalnym (syntetyczne kortykosteroidy) czy antymetabolitów o działaniu cytostatycznym (fluorouracyl) [69, 70].

Z nowszych kierunków badań kompleksowych warto wspomnieć o zagadnieniach prezentowanych na obecnie rozpoczynającym się XII Sympozjum Fluorowym.

Zagadnienie z zakresu stomatologii dotyczy wykorzystania analizy chemicznej biopierwiastków do oceny przebudowy mineralnej zębów w ciągu życia osobniczego [71]. Przebudowa mineralna zębów trwa przez cały okres życia, jednak największe zmiany ilościowe mają miejsce w najwcześniejszych okresach, czyli od 6. tygodnia życia płodowego [72]. Badania przebudowy mineralnej w zawiązkach zębowych są jednak utrudnione ze względu na małą masę zawiązka oraz trudności z zebraniem odpowiedniej ilości materiału badawczego. Jedną z pierwszych takich prac były badania wykonane przez *Gedalia i wsp.* w Izraelu w latach 70. ubiegłego wieku [73]. Wtedy jednak metody analityczne były mniej precyzyjne, co miało wpływ na uzyskane wyniki i ich interpretację [74]. Znaczny postęp odnotowano po opublikowaniu badań wykonanych przez *Pawlusa i wsp.* dotyczących oceny przebudowy zębów w tym 61 zawiązków zębowych, w których dynamika tych procesów jest największa [75]. Zbadano zawartość kilku pierwiastków, ale szczególną uwagę zwrócono na fluorki. Ich ilości w zawiązkach są tak wysokie, jak w żadnej innej powstającej tkance w organizmie człowieka. Na drodze interpolacji można było oszacować zawartość fluorków w chwili tworzenia się zawiązka. Wyniki *Pawlusa i wsp.* różnią się od danych *Gedalia i wsp.* i stanowią ciekawy materiał w dyskusji na temat preferowanego przez niektórych badaczy prenatalnego podawania fluorków, które jak wiadomo są toksyczne [76].

Drugim ważnym tematem z zakresu medycyny jest przedstawienie roli dwóch pierwiastków: fluoru i glinu, występujących w kompleksie AlF_x i ich łącznego oddziaływania na organizm ludzki [77]. Znaczna zawartość fluorków w wodzie przeznaczonej do spożycia na niektórych terenach endemicznych zapoczątkowała nowy zakres badań u ludzi, które dotyczyły oddziaływania związków fluoru na układ nerwowy. Pierwsze doniesienie przedstawili *Mullenix i wsp.* [78] w 1995 r. i dotyczyło ono neurotoksyczności fluorku sodu, a rok później *Zhao i wsp.* wypowiedzieli się na temat związku wysokich stężeń fluorków zawartych w wodzie z ilorazem inteligencji u dzieci w Chinach [79]. W roku 2000 *Spittle* z Nowej Zelandii podsumował prace kilku autorów z ostatnich 5 lat na temat wpływu fluoru na funkcje intelektualne u ludzi [80]. Była o tym zagadnieniu również mowa w czasie Sympozjum Fluorowego w Szczecinie w 2002 r. [81]. Jeszcze większe znaczenie w tym zakresie przypisuje się kompleksowi AlF_x , który zdaniem *Struneckiej* jest odpowiedzialny za przekaz fałszywych informacji, które są następnie powielane podczas przekształcania ich w odpowiedź komórkową [82]. Kompleks AlF_x może naśladować działanie wielu neuroprzekazników i hormonów. Badania

Lubkowskiej potwierdziły, że podawanie AlF_3 powoduje wzrost zawartości glinu w wybranych strukturach ośrodkowego układu nerwowego szczurów [83]. Nie wykazano sposobów eliminacji glinu z mózgu i dlatego przy długotrwałej ekspozycji może dojść do kumulacji pierwiastka, co może mieć związek z etiologią choroby Alzheimera [84]. Kompleksy fluorku glinu (AlF_x) powstają w sposób spontaniczny w wodnych roztworach, które zawierają fluorki i śladowe ilości glinu. Istnieją przesłanki pozwalające sądzić, że kompleksy AlF_x zachowują się jak analogi fosforanów [85]. Przenoszenie grup fosforanowych jest podstawowym mechanizmem kontroli przemian biochemicznych u zwierząt i roślin, a fosforylacje i defosforylacje przebiegają przy udziale enzymów: kinaz i fosfataz. Podobieństwo atomów Al do P, jako pierwiastków o podobnej budowie atomowej ze względu na powłoki elektronowe, odnosi się do powstawania różnych co do trwałości wiązań chemicznych między tymi pierwiastkami. Procesy metaboliczne stanowią zwykle cykl przemian następujących po sobie reakcji, które są trudne do badania w warunkach laboratoryjnych. Nowością jest zastosowanie do takich badań modelowania molekularnego [86]. Za pomocą programu Gaussian udało się prześledzić niektóre etapy przemian molekularnych między związkami wysokoenergetycznymi nukleotydów adeninowych i guaninowych, a kompleksami AlF_x [47]. Badania te przybliżają poznanie mechanizmów przemian na poziomie molekularnym i pozwalają poznać każdy fragment wieloetapowych procesów biochemicznych, co w warunkach laboratoryjnych jest prawie nieosiągalne [87].

Fluor jest pierwiastkiem o dużej aktywności chemicznej, dlatego pamiętać należy o możliwościach wywoływania pozytywnych i negatywnych skutków biologicznych, z których nie wszystkie udało się do tej pory poznać.

Piśmiennictwo

1. *Chlubek D.*: Fluoride in medicine, biology and toxicology. Borgis LTD, Warszawa 2003.
2. *Machoy Z., Chlubek D., Samujło D.*: Analityka związków fluoru. Met. Fluoru, 1996, 7, 1–53.
3. *Durda A., Machoy Z., Siwka W., Samujło D.*: Ocena sposobów przygotowania materiału badawczego do oznaczania fluorków. Bromat. Chem. Toksykol. 1986, 19 (4), 209–213.
4. *Fresen J.A., Cox F.H., Witter M.J.*: The determination of fluoride in biological material by means of gas chromatography. Pharm. Weekbl. 1968, 103, 909.
5. *Machoy Z., Samujło D.*: Comparison of method used to estimate F- in plants. Fluoride, 1983, 16 (1), 51–54.
6. *Łagocka R.*: Opracowanie metody pobierania mikroprob szkliwa w celu analizy zawartości fluorków i magnezu w powierzchniowych warstwach szkliwa stałych zębów ludzkich w badaniach in vitro. [Maszynopis powielany] Pom. Akad. Med. Szczecin 2000.
7. *Wang C.J., Xu J.*: Developments in the analysis of fluoride 1980–1990. Fluoride, 1993, 26 (3), 203–208; 1994, 27 (2), 97–107, 1996, 29 (2), 82–88; 1998, 31 (2), 74–80.
8. *Miller G.*: Fluoride: a toxic substance, Fluoride, 1997, 30 (3), 141.
9. *Minta M., Biernacki B., Włodarczyk B.*: Toksyczność prenatalna fluoru: podsumowanie badań na gryzoniach. Met. Fluoru, 1998, 8, 33–39.

10. *Wędzisz A.*: Próba oznaczenia fluoru potencjalnie przyswajanego ze środków spożywczych. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1994, 27, 353–357.
11. *Wędzisz A.*: Ocena optymalnego pobierania fluoru z żywności i jego biologicznej dostępności. *Akad. Med. w Łodzi, Łódź* 1998.
12. *Machoy-Mokrzyńska A.*: Wpływ mleka i masła na zawartość fluorków w surowicy szczurów eksponowanych na pary fluorku amonowego. *Met. Fluoru*, 1996, 7, 76–78.
13. *Markiewicz J., Sadlik J.*: Przypadki ostrych, śmiertelnych zatruc związkami fluoru w praktyce Instytutu Ekspertyz Sądowych. *Met. Fluoru*, 1988, 4, 17–20.
14. *Dadej N., Kośmider K., Machoy Z., Samujło D.*: Case history of acute poisoning by sodium fluorosilicate. *Fluoride*, 1987, 20 (1), 11–13.
15. *Machoy Z.*: O związkach łagodzących skutki nietolerancji wobec fluorków. *Czas. Stomatol.* 1983, 36 (9), 649–652.
16. *Giżewska M., Machoy Z.*: Czynniki wpływające na wchłanianie i wydalanie fluoru u ludzi i zwierząt. *Czas. Stomatol.* 1988, 61 (10), 603–609.
17. *Machoy Z., Machoy-Mokrzyńska A.*: Mechanisms of fluoride elimination and detoxication in living organisms. *Fluoride*, 1990, 23(4), 151–153.
18. *Protasowicki M., Machoy Z., Ciereszko W., Samujło D.*: Jakość zdrowotna żywności w świetle obecności wybranych zanieczyszczeń chemicznych. Stan środowiska miasta i rejonu Szczecina. *STN*, 1993, 285–294.
19. *Żejmo M., Stacewicz J., Machaliński B.*: Wpływ fluorku sodu na ludzką hematopoezę. *Met. Fluoru*, 1998, 8, 161–165.
20. *Grućka-Mamczar E., Birkner E., Stawiarska-Pięta B., Duliban H., Polaniak R. et al.*: Aktywność wybranych enzymów i stężenie amoniaku w surowicy krwi szczurów z hiperglikemią fluorkową. *Met. Fluoru*, 2004, 11, 27–28.
21. *Mikulski T., Pilawska H., Sych Z.*: Stężenie fluorków w moczu u ludzi. *Met. Fluoru*, 1992, 5, 48–49.
22. *Borysewicz-Lewicka M., Gromadzińska-Zaplata E., Krzyżaniak E., Świdzińska S., Rydzewska A.*: Poziom fluorków w moczu niemowląt i małych dzieci karmionych naturalnie i sztucznie. *Met. Fluoru*, 1998, 8, 29–32.
23. *Dąbkowska E., Letko R.*: Wpływ fluorku na środowisko jamy ustnej szczura pijącego wodę z fluorkiem sodu. *Met. Fluoru*, 2002, 10, 159–165.
24. *Inkielewicz I., Czarnowski W., Krechniak J.*: Oznaczanie fluorków w tkankach miękkich. *Met. Fluoru*, 2004, 11, 32–33.
25. *Mikolajek W., Jakubowska K., Ogoński T.*: Ocena zawartości fluorków w nerkach szczurów eksponowanych na działanie fluoru drogami pokarmową lub wziewną. *Met. Fluoru*, 1996, 7, 72.
26. *Sikorska-Jaroszyńska M., Czelej G.*: Fluor w stomatologii i medycynie. *Wyd. Czelej, Lublin* 2000.
27. *Machoy A., Sześciński W.*: Kumulacja fluorku w paznokciach. *Czas. Stomatol.* 1986, 39 (1), 705–709.
28. *Bober J.*: Ocena przydatności oznaczeń fluoru w kościach i paznokciach u ludzi. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1993, 26, 175–177.
29. *Krechniak J.*: Włosy jako wskaźnik narażenia na fluorki. *Met. Fluoru*, 1992, 5, 35–37.
30. *Zakrzewska H., Brzezińska M., Orowicz W., Samujło D., Wójcik A. et al.*: Zawartość fluorków w sierści i racicach dzików oraz zwierzyny płowej pochodzącej z terenów Pomorza Zachodniego jako indykator skażenia środowiska naturalnego. *Met. Fluoru*, 2004, 11, 53–54.
31. *Samujło D., Machoy-Mokrzyńska A., Dąbkowska E., Nowicka W., Paterkowski W.*: Fluoride accumulation in european antlers. *Environ. Sci.* 1994, 2 (4), 189–194.
32. *Machoy P., Mokrzyński S., Bober J.*: Udział fluoru w procesie formowania się kamieni moczowych. *Met. Fluoru*, 1994, 6, 39–40.
33. *Rać M., Stachowska E., Machoy Z.*: Shell of snail *Helix aspersa maxima* (*Helicidae*) as a protection of bioaccumulation toxic sodium fluoride in soft tissue. *Folia Biol.* 2005, 53, 235–238.
34. *Machaliński B., Sowiński M., Samujło D., Steciewicz I., Zawierta J.*: Rozkład fluoru w kościach i skorupach jaj kury domowej eksponowanej na działanie fluorku sodu. *Met. Fluoru*, 1994, 6, 77–79.
35. *Marciniec B., Dettlaff K., Bafeltowska J.*: Wpływ podstawnika fluorowego na trwałość radiochemiczną niektórych leków pochodnych steroidów i azoli. *Met. Fluoru*, 2004, 11, 44–45.
36. *Chlubek D., Machoy Z.*: Znaczenie wpływu wielkości dawki fluoru na aktywność enzymów w badaniach in vivo oraz in vitro. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1989, 22 (3–4), 235–245.
37. *Skupień-Wysocka K., Cholewiński A.*: Ocena wpływu fluorku sodowego na kiełkowanie i aktywność wybranych enzymów w siewkach grochu. *Met. Fluoru*, 1998, 8, 174–178.
38. *Karczmarek G., Samujło D., Machoy Z., Wdowczyk D.*: Wpływ fluorków na kiełkowanie wybranych gatunków roślin. *Met. Fluoru*, 1988, 4, 101–103.
39. *Machoy Z.*: O mechanizmie powstawania fluorozę zębowej. *Czas. Stomatol.* 1987, 40, 186–191.
40. *Żuk T.*: Lecznicze zastosowanie fluoru w chorobach narządu ruchu. *Metabolizm fluoru, STN. PWN, Warszawa-Poznań* 1982, 91–94.
41. *Szamańska H., Goertz W., Parafiniuk W.*: Próba wywołania hiperglikemii u szczurów za pomocą fluorku sodowego. *Metabolizm fluoru. STN. PWN, Warszawa-Poznań* 1982, 186–191.
42. *Dąbkowska E., Ogoński T., Bohatyrewicz A., Samujło D., Nocoń I. et al.*: Zmiany składu mineralnego w kości korowej i gąbczastej występujące w osteoporozie i zwyrodnieniu. *Met. Fluoru*, 1996, 7, 30–31.
43. *Wardas M., Jurczak T., Pawłowaska-Góral K., Kotrys-Puchalska E.*: Effects of fluoride and ascorbic acid on collagen biosynthesis in mouse liver fibroblast cultures. *Fluoride*, 2002, 35 (2), 104–109.
44. *Gumińska M.*: Wpływ fluorków na gospodarkę energetyczną in vitro i in vivo oraz związane z tym efekty biologiczne. *Met. Fluoru*, 1994, 6, 9–12.
45. *Ogoński T.*: Wpływ fluorków na oddychanie mitochondrialne. *Met. Fluoru*, 1999, 9, 99–105.
46. *Machoy-Mokrzyńska A.*: Fluor czynnikiem przedwczesnego starzenia. *Met. Fluoru*, 2004, 11, 15–17.
47. *Zakrzewska H., Szyperska A., Machaliński B., Machoy Z.*: Interakcje pomiędzy AIF_x a cAMP i cGMP uczestniczącymi w inicjacji ruchu plemnika oceniane na podstawie modelowania molekularnego. VIII Środowiskowa Konferencja Naukowa Chemików, Poznań, 5–7 czerwca 2006, 168.
48. *Waldbott G., Burgstahler A., McKinney H.*: Fluoridation-the great dilemma. *Coronado Press Inc.* 1978.
49. *Kabata-Pendias A., Pendias H.*: Pierwiastki śladowe w środowisku biologicznym. *Wyd. Geologiczne, Warszawa* 1979.
50. *Machoy-Mokrzyńska A., Machoy Z.*: Another look at the interactions of fluorine with calcium. *Fluoride*, 1993, 26 (4), 237–239.
51. *Machoy-Mokrzyńska A.*: Fluoride-magnesium interaction. *Fluoride* 1995, 28 (4), 175–177.
52. *Gumińska M.*: Interakcje fluoru i magnezu w badaniach in vitro i in vivo. *Met. Fluoru*, 1986, 3, 67–72.
53. *Floriańczyk B., Papierkowski A., Pasternak K.*: Wpływ fluorku sodu na aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej. Ochronny efekt magnezu. *Met. Fluoru*, 1996, 7, 41–44.
54. *Bialecki P., Bohatyrewicz A., Bialecka M., Pankowski J.*: Rola fluoru, wapnia i magnezu w procesie reparacyjnym uszkodzonej kości szczura. *Met. Fluoru*, 1998, 8, 128–132.
55. *Ey-Chmielewska H., Łagocka R., Opalko K., Frączak B.*: Zawartość wybranych biopierwiastków w powierzchniowych warstwach szkliwa ludzkich zębów stałych bez uszkodzeń i z patologicznym starciem. (Badania in vitro). *Met. Fluoru*, 1999, 9, 72–77.
56. *Machoy-Mokrzyńska A., Mokrzyński S.*: Oznaczanie selenu w wąsach szczurów narażonych na fluorek amonu. *Met. Fluoru*, 1999, 9, 122–125.
57. *Lubkowska A., Chlubek D., Machoy-Mokrzyńska A., Nocoń I., Żyłuk B. et al.*: Stężenie fluoru, glinu i magnezu w wybranych strukturach ośrodkowego układu nerwowego szczurów eksponowanych na glin i fluor w wodzie pitnej. *Met. Fluoru*, 2004, 11, 41–44.
58. *Salicki W., Kalisińska E.*: Fluor i wapń w kościach grzywacza. *Met. Fluoru*, 2004, 11, 49–51.

59. Majnusz U., Wardas W.: Interakcja F- i jonów wybranych metali Cd²⁺, Pb²⁺ i Hg²⁺ w oddziaływaniu na wzrost hodowli laboratoryjnych glonów chlorella. *Met. Fluoru*, 1998, 8, 166–173.
60. Zawierta J., Dąbkowska E., Jakubowska K., Olszewska M., Nocoń I.: Zawartość fluoru, miedzi, żelaza, cynku i selenu w osoczu u ludzi zdrowych, zamieszkujących w Szczecinie i jego okolicach. *Met. Fluoru*, 1998, 8, 200–204.
61. Floriańczyk B.: Wpływ fluoru na poziom miedzi w tkankach szczurów. *Met. Fluoru*, 1999, 9, 126–130.
62. Machoy Z.: Odmiennie mechanizmy wiązania fluorku przez kość i ząb. *Czas. Stomatol.* 1987, 40 (3), 187–191.
63. Machoy Z.: Wpływ związków fluoru na enzymy oddechowe. *Post. Biochem.* 1981, 27, 327–337.
64. Chlubek D., Machoy Z.: Znaczenie wpływu wielkości dawki na aktywność enzymów in vivo oraz in vitro. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1989, 22, 235–244.
65. Lembas M., Machoy Z.: Krążenie fluoru w jamie ustnej. *Czas. Stomatol.* 1987, 40, 375–380.
66. Pilawska H.: Ocena stanu zdrowia i rozwoju dzieci z rejonu Polic i terenów kontrolnych. *STN*, 1986.
67. Marciniak B.: Różne oblicza fluoru w chemii leków. *Met. Fluoru*, 2004, 11, 14.
68. Zieliński K., Machoy Z.: Zastosowanie związków fluoroorganicznych jako substytutu krwi. *Metabolizm fluoru*. PWN, Warszawa–Poznań 1982, 131–136.
69. Jacyszyn K.: Związki fluoroorganiczne, ich rola biologiczna i toksyczność. *Metabolizm fluoru*. PWN, Warszawa–Poznań 1982, 131–136.
70. Chmielewski K., Jankowska D., Stępińska A.: Próba doboru optymalnych parametrów w oznaczaniu 5-fluorouracylu w osoczu krwi ludzkiej metodą chromatografii gazowej. *Metabolizm fluoru*. PWN, Warszawa–Poznań 1982, 19–22.
71. Schroeder H.: *Oral Strukturbiologie*. Georg. Thieme Verlag, Stuttgart–New York 1992.
72. Molleson T.: Trace elements in human teeth. *Trace elements in environmental history*. Springer Verlag. Berlin–Heidelberg–New York–London–Paris–Tokyo 1987, 67–82.
73. Gedalia I., Brzeziński A., Portuguese N. et al.: The fluoride content of teeth and bones of human fetuses. *Arch. Oral. Biol.* 1964, 9, 331–340.
74. Gedalia I.: *Fetal calcification*. Biological Mineralization. John Wiley and Sons, Inc. 1973.
75. Pawlus G., Machoy Z., Gutowska I., Machoy-Mokrzyńska A., Machaliński B.: Ocena dynamicznej przebudowy zębów na podstawie analizy zawartości składników mineralnych w ciągu życia osobniczego. *Czas. Stomatol.* 2004, 58 (12), 798–803.
76. Glenn F., Lenn W., Duncan R.: Prenatal fluoride tablet supplementation and the fluoride content of teeth. Part VIII. *J. Dent. Child.* 1984, 51, 344–351.
77. Lubkowska A., Żyluk B., Chlubek D.: Interactions between fluorine and aluminium. *Fluoride*, 2002, 35 (2), 73–77.
78. Mullenix P., Denbesten P., Schunior A., Kernan W.: Neurotoxicity of sodium fluoride in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 1995, 17, 169–177.
79. Zhao L., Liang G., Zhang D., Wu X.: Effect of high fluoride water supply on children's intelligence. *Fluoride*, 1996, 29, 190–192.
80. Spittle B.: Fluoride and intelligence. *Fluoride*, 2000, 33, 49–52.
81. Machoy Z.: Fluor a inteligencja. *Met. Fluoru*, 2002, 10, 11–13.
82. Strunecka A.: Fluoride and aluminium: Messenger of false information. *Fluoride*, 2002, 35 (4), 244.
83. Lubkowska A.: Interakcje pomiędzy fluorem i glinem w organizmie szczura ze szczególnym uwzględnieniem struktur ośrodkowego układu nerwowego. [Maszynopis powielany] *Pom. Akad. Med. Szczecin* 2005.
84. Strunecka A., Patocka J.: Reassessment of the role of aluminium with development of Alzheimer's disease. *Fluoride*, 2002, 35 (1), 56.
85. Strunecka A., Stringency O., Patocka J.: Fluoride plus aluminium. Useful tools in laboratory investigation, but messengers of false information. *Physiol. Res.* 2002, 51, 557–564.
86. Forster M.: Molecular modeling in structural biology. *Micron*, 2002, 33, 365–384.
87. Szyperska A.: Aktywność biologiczna kompleksów glinowo-fluorowych. *Wszczęświat* (wysłane do druku).

TAMARA PAWLACZYK-KAMIENSKA, MARIA BORYSEWICZ-LEWICKA, KAROL JÓŹWIAK¹

BADANIA ZAWARTOŚCI FLUORKÓW W PRÓBKACH NADDZIAŚŁOWEGO KAMIENIA NAZĘBNEGO METODĄ MIKROANALIZY RENTGENOWSKIEJ

FLUORIDE CONTENT IN SUPRAGINGIVAL DENTAL CALCULUS MEASURED WITH X-RAY MICROANALYSIS

Klinika Stomatologii Dziecięcej, Katedra Stomatologii Dziecięcej Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego
ul. Bukowska 7, 60-812 Poznań

Kierownik: prof. dr hab. n. med. *Maria Borysewicz-Lewicka*

¹ Laboratoire de Mécanique IUT "A" Université Lille

Boulevard Paul Langevin, Cité Scientifique, 59655 Villeneuve d'Ascq cédex, France

Director: Prof. *Isam Shahrour*

Summary

Purpose: Sparse reports on the composition of mineralized deposits forming in the child's oral cavity generally reveal their lower degree of mineralization. As reports on the formation of dental calculus in children are incomplete, we decided to study some conditions in which this process takes place.

The aim of the study was to determine whether fluorine is present in supragingival dental calculus. We enrolled 12-year-old children (17 girls, 11 boys) living in a large city.

Results: X-ray microanalysis of dental calculus revealed the presence of carbon, oxygen, calcium, phosphorus, sodium, magnesium, potassium, sulphur, chlorine, silicon, and fluorine. Chemical analysis of 10 sites on each specimen showed large variations as to the number of elements found and their content. Fluorine was present in one specimen only (3.6%) at a very high concentration of $10.27\% \pm 1.27$ (w/w).

Chemical composition of mineralized dental deposits shows marked individual variability and the presence of fluorine is not a constant finding.

Key words: EDS – SEM – children.

Streszczenie

Wstęp: Nieliczne doniesienia dotyczące składu złogu mówią ogólnie o mniejszym stopniu zmineralizowania u osób

w wieku rozwojowym. Skąpa liczba doniesień dotyczących powstawania kamienia nazębnego u dzieci była podstawą do podjęcia badań zmierzających do wyjaśnienia pewnych uwarunkowań tego procesu.

Celem pracy była ocena występowania fluoru w nadziąsłowym kamieniu nazębnym pobranym od 12-letnich dzieci zamieszkujących środowisko wielkomiejskie.

Wyniki: Wyniki badań przeprowadzonych metodą mikroanalizy rentgenowskiej wykazały w kamieniu nazębnym obecność: węgla, tlenu, wapnia, fosforu, sodu, magnezu, potasu, siarki, chloru, krzemu oraz fluoru. Wyniki mikroanalizy rentgenowskiej przeprowadzonej w 10 losowo wybranych punktach różniły się znacznie, zarówno co do liczby wykrytych pierwiastków jak i ich stężenia. Tylko w jednej (3,6%) próbce stwierdzono obecność fluoru. Jego stężenie było wysokie i wynosiło $10,27\% \text{ wag.} \pm 1,27$.

Skład chemiczny kamienia nazębnego tworzącego się u dzieci jest osobniczo zróżnicowany, a fluor nie jest stałym składnikiem tego złogu.

H a s ł a: EDS – SEM – dzieci.

Wstęp

Kamień nazębny powstaje w wyniku mineralizacji bakteryjnej płytki nazębnej. Proces mineralizacji polega na wytrącaniu soli wapniowo-fosforanowych w macierzy organicznej płytki. Przebieg procesu zależy od złożonych

bio- oraz fizykochemicznych reakcji zachodzących w środowisku jamy ustnej oraz od licznych czynników wewnątrz- i zewnątrzpochodnych, do których należą m.in. skład śliny, płynu dziąsłowego, flory mikrobiologicznej jamy ustnej, higieny oraz diety.

Z badań epidemiologicznych wynika, że kamień nazębny występuje u ludzi stosunkowo często. Jego ilość i lokalizacja jest różna w zależności od nawyków higienicznych, diety, wieku osobniczego, pochodzenia etnicznego, sprawności fizycznej i umysłowej, występujących chorób ogólnoustrojowych lub systemowych oraz stosowanych leków. Udowodniono, że odsetek osób w populacji, u których występuje kamień nazębny wzrasta wraz z wiekiem badanych [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7]. U dzieci rzadziej niż u osób dorosłych obserwowane jest tworzenie zmineralizowanych złogów nazębnych. W tej grupie odkładanie jest mniejsze pomimo tworzenia często dużych ilości płytki nazębnej. Obserwacja ta dotychczas nie uzyskała swego wyjaśnienia. *Stoner* i *Mazdyasna* przypuszczają, że zależy to m.in. od różnej zawartości inhibitorów precypitacji fosforanów wapnia w ślinie dzieci i osób dorosłych. Przyczyną może być również różnica w składzie flory bakteryjnej zasiedlającej jamę ustną. Mikroorganizmy jamy ustnej dziecka mogą nie zawierać lub nie produkować soli mineralnych, a niektóre z nich wytwarzają inhibitory procesu mineralizacji [8]. Zaobserwowano, że szybkość odkładania kamienia nazębego jest osobniczo zróżnicowana i jest szybsza u chłopców niż u dziewcząt [5, 6].

Biorąc pod uwagę umiejscowienie kamienia nazębego w stosunku do brzegu dziąsłowego rozróżnia się złóg naddziąsłowy – widoczny na koronach klinicznych zębów ponad brzegiem dziąsłowym oraz złóg poddziąsłowy – odkładający się w kierunku wierzchołka korzenia w kieszonce przyzębnej. Wyodrębniła się również formę pośrednią, tzn. złóg umiejscowiony przy brzegu dziąsła [5, 6].

Skład chemiczny kamienia nazębego jest osobniczo zróżnicowany. Zawartość składników mineralnych zależy głównie od wieku złogu, rodzaju i jego umiejscowienia w jamie ustnej. Dojrzały kamień nazębny jest substancją wysoce mineralizowaną, o ilości składników nieorganicznych podobnej do kości, zębiny i cementu, tj. ok. 70–85% s.m. Faza nieorganiczna kamienia nazębego to przede wszystkim sole wapnia i fosforanów. Zbadano, że wapń stanowi do 40%, a fosforany do 20% suchej masy substancji nieorganicznej kamienia [2, 5, 6]. Poza tym zidentyfikowane zostały także inne pierwiastki, jak: magnez, sód, cynk, fluor, chrom, stront, brom, miedź, mangan, wolfram, złoto, glina, krzem, żelazo, srebro, węgiel. Fluor związany jest przede wszystkim z fazą organiczną kamienia, choć może również występować w połączeniu z fosforanem wapnia [1, 2, 9, 10, 11, 12, 13].

Badania kamienia nazębego utworzonego w jamie ustnej dziecka były prowadzone rzadko i dotyczyły głównie oceny epidemiologicznej. Nieliczne dane z piśmiennictwa, mówiące ogólnie o mniejszym zmineralizowaniu złogu u dzieci, są zgodne z wynikami prowadzonych wcześniej badań własnych, które wykazały, że złóg naddziąsłowy

powstający w jamie ustnej dziecka zawiera mniej związków nieorganicznych [14].

Celem pracy było podjęcie badań zmierzających do wyjaśnienia pewnych uwarunkowań procesu powstawania kamienia nazębego u osób w wieku rozwojowym oraz ocena występowania fluoru w naddziąsłowym kamieniu nazębnym pobranym od 12-letnich dzieci, zamieszkujących środowisko wielkomiejskie.

Material i metody

Do analizy został pobrany kamień nazębny naddziąsłowy z powierzchni językowych dolnych zębów siecznych 28 dzieci (17 dziewcząt i 11 chłopców). Próbkę złogu przechowywano w specjalnych pojemnikach. Następnie przyklejano je do stolika elektronowego mikroskopu skaningowego i umieszczano w komorze obserwacyjnej. Przed badaniem próbki napyłano warstwą węgla. Spektra kamienia gromadzono z obszaru $80\ \mu\text{m} \times 120\ \mu\text{m}$ pokazanego na obrazach uzyskanych za pomocą elektronowego mikroskopu skaningowego JEOL–JSM35C przy napięciu 15 kV. Ponieważ kamień nazębny ma strukturę niejednorodną, konieczne było przeprowadzenie analizy składu chemicznego w kilku punktach (ryc. 1). Stężenie pierwiastków w próbce z 10 losowo wybranych punktów badano metodą mikroanalizy rentgenowskiej EDS za pomocą detektora Si (Li) PRISM firmy PGT. Oceniano występowanie wszystkich pierwiastków obecnych w próbce i wykrywanych stosowaną techniką.

Do bezwzorcowej analizy ilościowej uwzględniającej pierwiastki lekkie użyto programu korekcji ZAF.

Analizę kamienia nazębego przeprowadzono w Laboratorii Mecanique IUT “A” Uniwersytetu Lille we Francji.

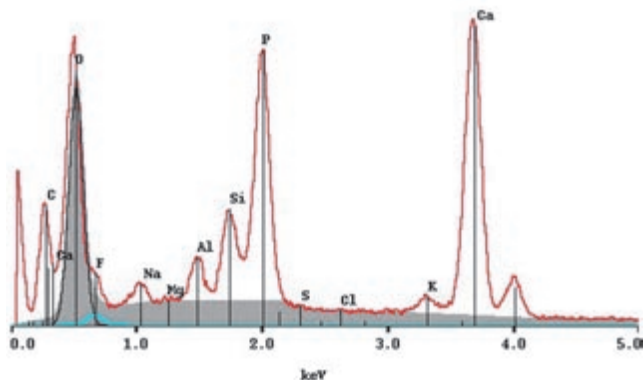
Wyniki

Wyniki badań przeprowadzonych metodą mikroanalizy rentgenowskiej wykazały w kamieniu nazębnym, pochodzącym od dzieci w wieku 12 lat, obecność następujących pierwiastków: węgla, tlenu, wapnia, fosforu, sodu, magnezu, potasu, siarki, chloru, krzemu oraz fluoru (ryc. 2). Wyniki mikroanalizy rentgenowskiej poszczególnych punktów tej samej próbki różniły się znacznie, zarówno co do liczby wykrytych pierwiastków, jak i ich stężenia. Różnice dotyczyły wszystkich spośród badanych pierwiastków.

Obecność fluoru stwierdzono tylko w jednej (3,6%), pochodzącej od chłopca, z poddanych badaniu próbek. Jego stężenie było wysokie i wynosiło $10,27\% \text{ wag.} \pm 1,27$.

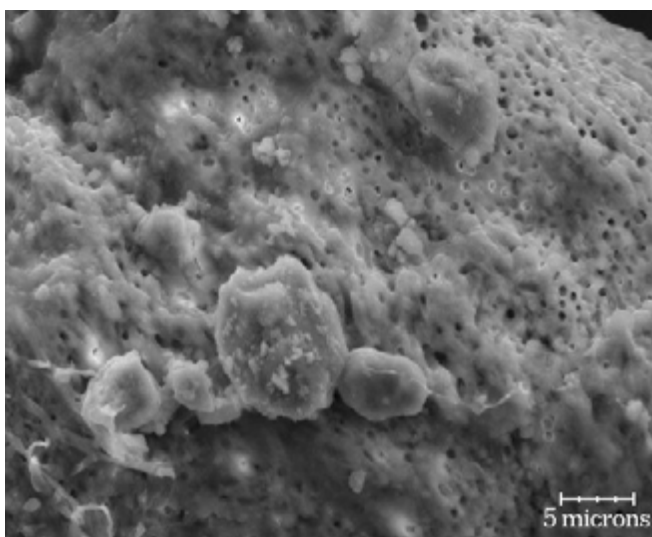
Dyskusja

Złóg naddziąsłowy jest mniej zmineralizowany niż poddziąsłowy. Odsetek składników mineralnych w kamieniu naddziąsłowym waha się od 16% do 80%, a w złogu



Ryc. 1. Spektre EDS naddziąsłowego kamienia nazębnego

Fig. 1. EDS of supragingival dental calculus



Ryc. 2. SEM naddziąsłowego kamienia nazębnego

Fig. 2. SEM of supragingival dental calculus

poddziąsłowym od 46% do 83%. Kamień poddziąsłowy zawiera zazwyczaj nieco więcej wapnia, magnezu i fluoru. Zawartość wapnia w kamieniu naddziąsłowym wynosi ok. 35%, fosforanów ok. 20%. W kamieniu poddziąsłowym, zlokalizowanym w pobliżu dziąsła, odpowiednio: ok. 39% i 21% a w złożu umieszczonym głęboko w kieszonce: 39,5% i 21% [2, 5, 6]. W zawartości fluoru Okumura i wsp. nie zaobserwowali istotnej różnicy w złożu nad- i poddziąsłowym. Stwierdzili jednak, że w kamieniu poddziąsłowym jego poziom jest wyraźnie niższy w złożu gromadzącym się w kierunku wierzchołka korzenia, natomiast w naddziąsłowym nie zmienia się w zależności od umiejscowienia na koronie zęba [4].

Celem badań Ji i wsp. była ocena zawartości magnezu i fluoru w kamieniu nazębnym u osobników narodowości chińskiej i japońskiej. Stwierdzili wyższą zawartość tych pierwiastków u Japończyków. Fakt ten tłumaczyli rodzajem spożywanych pokarmów (dieta bogata w owoce morza) oraz stosowaniem past do zębów zawierających fluor [15].

Okumura i wsp. stwierdzili wyższe stężenie fluoru na zewnętrznej powierzchni kamienia, które obniżało się w kierunku do wewnątrz, tj. w kierunku powierzchni zęba [4].

Wykazano, że niektóre pierwiastki występujące w niewielkiej ilości lub nawet jako pierwiastki śladowe mogą wpływać na przebieg procesu mineralizacji. Fluor stanowi niewielki odsetek w składzie kamienia, ale jednak jego obecność odgrywa istotną rolę w nukleacji i hydrolizie kryształów. Również krzem bierze udział w formowaniu i mineralizacji złożu – działa jako promotor nukleacji. Jak wynika z badań, każdy z etapów procesu może zostać zaburzony obecnością nawet niewielkiej ilości „obcych jonów” (tzw. trucizn kryształów), które łączą się z miejscami wysokoenergetycznymi w kryształach i blokują adsorpcję jonów prawidłowych [2, 4, 5, 10, 13, 15, 16, 17].

Na podstawie piśmiennictwa i wyników badań własnych można stwierdzić, iż kamień nazębny pobrany od dzieci w wieku 12 lat w porównaniu ze złożem uzyskanym od osoby dorosłej zawiera mniej składników nieorganicznych (niższy jest poziom wapnia oraz fosforu), natomiast wyższa jest zawartość węgla. Wyniki mikroanalizy rentgenowskiej wskazują ogólnie na niższy stopień zmineralizowania złożu. Natomiast obecność miejsc o wysokiej zawartości składników nieorganicznych oraz takich, w których ich stężenie jest bardzo niskie, potwierdza doniesienia z piśmiennictwa o heterogennej budowie złożu, o różnym stopniu uwapnienia w poszczególnych miejscach. Skład chemiczny kamienia nazębnego utworzonego w jamie ustnej osób w wieku rozwojowym jest różny u poszczególnych jednostek, jak również różni się w zależności od analizowanego punktu tej samej próbki złożu [14].

We wcześniejszych badaniach własnych porównywano skład naddziąsłowego kamienia nazębnego pochodzącego od osoby dorosłej i od dziecka. Na podstawie analizy złożu pobranego od osoby dorosłej stwierdzono, że wapń stanowił 27,65% wag., fosfor 14,00% wag., a magnez 0,56% wag. Uzyskane wyniki dotyczące tych pierwiastków były więc porównywalne z danymi z piśmiennictwa. Bezwzorcowo analiza ilościowa EDS badanych próbek wykazała istnienie różnic w składzie kamienia nazębnego pobranego od dziecka i od osoby dorosłej, ponieważ w tej pierwszej % wag. wapnia wynosił 5,67, fosforu 6,02, magnezu 0,29. Wartości te były więc niższe niż podaje piśmiennictwo. W złożu pobranym od dziecka odnotowano natomiast wyższy poziom węgla i azotu. Różnice dotyczyły również zawartości innych, występujących w mniejszym odsetku, pierwiastków, jak sód, potas, magnez i siarka. Jedynie zawartość tlenu była porównywalna w obu próbkach. Również wartość stosunku Ca/P w próbce pochodzącej od osoby dorosłej była wyższa (1,98) w porównaniu z wartością Ca/P w złożu dziecka (0,94) [18].

Wnioski

Badania potwierdzają, iż skład chemiczny kamienia nazębnego tworzącego się w jamie ustnej dzieci jest osobniczo zróżnicowany, a fluor nie jest stałym składnikiem tego złożu.

Piśmiennictwo

1. *Bernimoulin J.P.*: Recent concepts in plaque formation. *J. Clin. Periodontol.* 2003, 30, Suppl. 5, 7–9.
2. *Driessens F.C.M.*: Mineral aspects of dentistry. In: *Monographs in Oral Science* Ed. H.M. Meyers. Philadelphia 1982.
3. *Jin Y., Yip H.K.*: Supragingival calculus formation and control. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2002, 13 (5), 426–441.
4. *Okumura H. et al.*: Distribution of fluoride in human dental calculus. *Caries Res.* 1993, 27, 271–276.
5. *Recent advances in the study of dental calculus.* Ed. J.M. Ten Cate. IRL Press, Oxford 1989.
6. *White D.*: Dental calculus: recent insights into occurrence, formation, prevention, removal and oral health effects of supragingival and subgingival deposits. *Eur. J. Oral Sci.* 1997, 105, 508–522.
7. WHO Kobe Centre Ageing and Health Technical Report (3). Global review on oral health in ageing societies. www.who.int (October 2002).
8. *Stoner J.E., Mazdyasna S.*: Gingival recession in the lower incisor region of 15-year-old subjects. *J. Periodontol.* 1980, 51, 2, 74–76.
9. *Abraham J. et al.*: Spectrochemical analysis of dental calculus by synchrotron radiation X-ray fluorescence. *Anal. Chem.* 2002 Jan. 15, 74 (2), 324–329.
10. *Borysewicz-Lewicka M.*: Badania nad wpływem fluoru na mineralizację we wczesnych stadiach tworzenia kamienia nazębnego. [Maszynopis powielany] Akad. Med. w Poznaniu, Poznań 1989.
11. *Borysewicz-Lewicka M.*: Ocena wczesnych stadiów mineralizacji płytki nazębnej w skaningowym mikroskopie elektronowym. *Czas. Stomatol.* 1990, 43, 7, 387–399.
12. *Galgut P.N., Mordan N., Newman H.N.*: A transmission electron microscopy study of supragingival calculus. *J. Int. Acad. Periodontol.* 2001, Apr. 3 (2), 31–37.
13. *Niemczura Z., Borysewicz-Lewicka M.*: Struktura krystaliczna kamienia nazębnego ludzi eksponowanych na związki fluoru. *Czas. Stomatol.* 1991, 44, 1, 34–38.
14. *Borysewicz-Lewicka M., Pawlaczek-Kamieńska T., Józwiak K.*: Badania porównawcze kamienia nazębnego u dziecka i osoby dorosłej za pomocą mikroanalizy rentgenowskiej. *Czas. Stomatol.* 1999, 52, 11, 729–732.
15. *Ji H. et al.*: Fluoride and magnesium concentrations in human dental calculus obtained from Japanese and Chinese patients. *Arch. Oral Biol.* 2000 Jul., 45 (7), 611–615.
16. *Borysewicz-Lewicka M.*: Wpływ miejscowego stosowania fluoru NaF na zawartość wapnia, fosforu i fluoru w młodym kamieniu nazębnym. *Protet. Stomatol.* 1989, 39, 4, 192–201.
17. *Huang S. et al.*: Fluoride distribution in human dental calculus obtained from different sites on the tooth surfaces. *J. Periodontol. Res.* 1996, 31, 149–156.
18. *Pawlaczek-Kamieńska T.*: Wybrane cechy środowiska jamy ustnej u dzieci ze skłonnością do mineralizacji bakteryjnej płytki nazębnej. [Maszynopis powielany] Akad. Med. w Poznaniu, Poznań 2005.

SYLWIA PIOTROWSKA, ZYGMUNT MACHOY, DARIUSZ CHLUBEK

PORÓWNANIE ZAWARTOŚCI WAPNIA, MAGNEZU, FLUORKÓW I FOSFORU W POROŻACH I KOŚCIACH CZASZEK SAREN (*CAPREOLUS CAPREOLUS*) W ZALEŻNOŚCI OD WIEKU

CALCIUM, MAGNESIUM, FLUORIDE, AND PHOSPHORUS CONTENT IN ANTLERS AND SKULL BONES OF ROE DEER (*CAPREOLUS CAPREOLUS*) IN RELATION TO AGE

Zakład Biochemii, Katedra Biochemii i Chemii Medycznej Pomorskiej Akademii Medycznej
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin
Kierownik: prof. dr hab. n. med. *Dariusz Chlubek*

Summary

Purpose: This study was undertaken to compare calcium, magnesium, fluoride, and phosphorus content in antlers and skull bones of roe deer in relation to their age and habitat.

Material and methods: The study was done in 22 samples originating from two Forestry Districts of West Pomerania. The study population was divided into two age groups: young animals (aged 1–2 years) and mature animals (aged 4–8 years). Calcium and magnesium was measured with atomic absorption spectrometry, phosphorus with a spectrophotometric method, and fluoride with an ion-selective electrode.

Conclusions: Statistical analysis demonstrated differences in the content of the elements depending on age and environmental pollution. Correlations between the content of elements in skull bones and antlers were found.

K e y w o r d s: roe deer – mineralization – antlers – skull bones – physiological osteoporosis – environmental biomonitoring.

Streszczenie

Wstęp: Celem niniejszej pracy było porównanie zawartości wapnia, magnezu, fluorków i fosforu w porożach i kościach czaszek saren w zależności od ich wieku i miejsca bytowania.

Material i metody: Badania przeprowadzono na 22 próbkach, pochodzących z dwóch nadleśnictw Pomorza Zachodniego. Materiał podzielono ponadto na 2 grupy ze względu na wiek: młode (1–2 lata) i stare (4–8 lat). Wapń i magnez oznaczono metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej, fosfor metodą spektrofotometryczną, a fluorki za pomocą elektrody jonoselektywnej.

Wnioski: Analiza statystyczna wyników wykazała różnice w zawartości poszczególnych pierwiastków zależne od wieku zwierzęcia a także stopnia zanieczyszczenia środowiska naturalnego. Przedstawiono korelacje między analizowanymi pierwiastkami w kościach czaszek i porożach.

H a s ł a: sarna – mineralizacja – poroża – kości czaszki – fizjologiczna osteoporoza – biomonitoring środowiska.

Wstęp

Poroża są strukturą charakterystyczną dla rodziny jeleniowatych (*Cervidae*). Rozwijają się na trwale występujących wyniosłościach, zwanych moździeniami. Te ostatnie rozwijają się z kości czołowej czaszki [1]. Razem z zębami stanowią przykłady struktur kościopodobnych, wystających na zewnątrz [2]. Z powodu ich corocznego zrzucania i nadzwyczaj szybkiej regeneracji (do 2 cm na dobę), od dawna fascynują one naukowców i ludzi o zainteresowaniach przyrodniczych [3]. Są obiektem wielu

badan, m.in. wykorzystuje się je jako bioindykatory zanieczyszczeń środowiska związkami chemicznymi [4] albo jako modele do studiowania metabolizmu i chorób kości [5]. W wielu kulturach medycyna wykorzystuje ekstrakty z poroży jako środki wzmacniające w leczeniu niedokrwistości i anoreksji, w czasie chemioterapii czy radioterapii onkologicznej [6, 7].

Poroże saren zbudowane jest w ok. 56% z substancji nieorganicznej, na które składa się 48% fosforanu wapnia, 5% węglanu wapnia, 2% węglanu magnezu i 1% innych związków mineralnych [1]. Intensywny wzrost poroża u zwierząt był powodem opisanego zjawiska tzw. opróżnienia kości szkieletu podczas wzrostu, czyli odwracalnej, fizjologicznej osteoporozy kości [5].

Celem niniejszej pracy było zbadanie zmian dotyczących zawartości czterech głównych składników mineralnych poroża i kości czaszki: wapnia, magnezu, fluoru i fosforu w zależności od wieku i miejsca bytowania zwierząt, od których pobrano próbki.

Material i metody

Badania przeprowadzono na 22 próbkach poroży i kości czaszek saren (*Capreolus capreolus*), które pochodziły z planowanych odstrzałów myśliwskich na terenie województwa zachodniopomorskiego. Materiał badawczy podzielono na dwie grupy ze względu na wiek: młode (1–2 lata) i stare (4–8 lat) oraz wyodrębniono dwie grupy ze względu na pochodzenie zwierząt: Szczecin i Drawsko Pomorskie. Poroża, w pobliżu ich róz (u podstawy), a kości czaszki przy mózżdeniach, nawiercano wiertarką stomatologiczną. W celu oznaczenia wapnia i magnezu naważki w ilości ok. 750 mg rozpuszczano w 9 mL 65% kwasu azotowego. Po 3 dniach próbki mineralizowano za pomocą mineralizatora BM-1S/II, a następnie zawartość ww. pierwiastków oznaczano metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej używając spektrometru Unicam 969-Solar. Aby oznaczyć zawartość fluorków, naważki 10 mg mineralizowano w 1 mL kwasu nadchlorowego o stężeniu 2 mol/L. Próbkę wytrząsano w termomikserze przez 1 godz., w temperaturze 85°C, studzono i oznaczano stężenia fluorków za pomocą elektrody jonoselektywnej Orion. W celu oznaczenia w próbkach fosforu naważki 10 mg mineralizowano w 1 mL 65% kwasu azotowego i po 24 godz. oznaczano stężenia fosforu metodą spektrofotometryczną (UV/VIS Spectrometer Lambda 40 Perkin Elmer), stosując zestaw firmy Randox. Wyniki poddano analizie statystycznej, posługując się testem kolejności par Wilcoxon i testem U Manna–Whitneya.

Wyniki

W tabeli 1 przedstawiono średnie stężenia wapnia, fosforu, magnezu i fluorków w porożach i kościach czaszek

saren. W kościach czaszek stwierdzono większe stężenia wapnia niż w porożach, natomiast stężenia magnezu były większe w porożach niż w kościach saren z okolicy Szczecina i Drawsko Pomorskiego (ryc. 1 i 2). Średnia zawartość wapnia, fosforu (ryc. 3) i magnezu w porożach malała u zwierząt pochodzących z okolic Szczecina, a wzrastała u saren z okolic Drawsko Pomorskiego. Podobne zależności stwierdzono w przypadku magnezu w kościach czaszek, natomiast poziom fosforu w czaszkach rósł u zwierząt ze Szczecina, a malał u saren z Drawsko Pomorskiego. Zawartość fluorków (ryc. 4) u zwierząt z okolic Szczecina rosła wraz z wiekiem, zarówno w porożach, jak i kościach, a u saren z terenów Drawsko Pomorskiego wykazywała wzrost tylko w porożach, natomiast spadek w kościach. Na rycinach 1, 2 i 4 zaznaczono różnice istotne statystycznie w odniesieniu do stężenia poszczególnych pierwiastków w badanych strukturach, z uwzględnieniem podziału na wiek i miejsce bytowania zwierzęcia. Tylko w przypadku fosforu nie stwierdzono żadnych istotnych statystycznie różnic w jego zawartości (ryc. 3). Wykonano także obliczenia, które miały na celu wykazanie ewentualnych różnic statystycznych w zawartości poszczególnych pierwiastków pomiędzy porożami i kośćmi czaszek badanych saren, bez uwzględniania ich wieku i miejsca bytowania. Kształtowały się one następująco: dla wapnia $p = 0,003665$, dla fosforu $p = 0,139626$ i dla fluorków $p = 0,485171$. W tabeli 3 przedstawiono zestawienie współczynników średniej zawartości poszczególnych pierwiastków w porożach i kościach czaszek.

Dyskusja

Każdego roku jeleniowate zrzucają, a następnie odbudowują imponujące organy kostne, jakimi są poroża. Ze względu na ich podobieństwo do kości i ogromne możliwości regeneracyjne stanowią one fenomen biologiczny. Mechanizm regulujący cykl regeneracji poroża, jego mineralizację i zrzucanie, oparty jest na sezonowych zmianach poziomów hormonów we krwi [8]. W porożach zidentyfikowano dotychczas wiele molekuł, m.in. czynników wzrostu, które wpływają na ich regenerację [9]. Niekiedy równowaga hormonalna zostaje jednak zaburzona pod wpływem innych czynników np. w niskich temperaturach rozwijają się guzowate narośla przypominające nowotworowy rozrost kości, tzw. *antleromas* [10]. Z powodu szybkiego wzrostu tkanek budujących poroża, nawet 2 cm na dobę, jeleniowate nie są w stanie zapewnić w tak krótkim czasie odpowiedniej ilości substancji mineralnych, potrzebnych do regeneracji. Wtedy poroże czerpie składniki mineralne ze szkieletu kostnego. Dostarczane są one naczyniami krwionośnymi poprzez mózżdenie (nasady) osadzone na kościach czołowych czaszki [1]. Badając biochemiczne markery zmian w kościach – stężenie hydroksyproliny i osteokalcyny – wykazano odwrotną korelację pomiędzy porowatością w porożach a porowatością w kościach śródreżca [11] czy

Tabela 1. Zawartość wapnia (Ca), fosforu (P), magnezu (Mg) i fluorków (F) w porożach (a) i kościach czaszek (b) saren
Table 1. Calcium (Ca), phosphorus (P), magnesium (Mg), and fluoride (F) content in (a) antlers and (b) skull bones of roe deer

Pierwiastek / Element	n	Młode / Young		Stare / Old	
		Szczecin	Drawsko Pom.	Szczecin	Drawsko Pom.
		6	6	6	4
Ca/a	x	214,24840	178,91210	190,01670	183,70730
	SD	10,18918	34,13173	14,83010	19,08660
Ca/b	x	224,16260	198,65240	245,15340	215,63570
	SD	48,22799	31,78848	71,82510	7,75486
P/a	x	100,33680	96,67700	84,42850	101,97630
	SD	18,54931	23,70659	18,17544	16,61401
P/b	x	96,72870	112,36080	111,56460	104,09750
	SD	19,33286	14,17027	6,07622	22,73174
Mg/a	x	4,50230	4,05180	4,06770	4,59060
	SD	0,28246	0,96657	0,37820	0,21201
Mg/b	x	4,34280	3,64950	4,04390	4,56020
	SD	0,90443	0,51563	0,29076	0,23301
F/a	x	0,35090	0,29360	0,43130	0,36250
	SD	0,09936	0,09017	0,13096	0,05170
F/b	x	0,39820	0,33290	0,50350	0,29350
	SD	0,10772	0,16153	0,15256	0,10388

żeber [12]. Dla mineralizacji poroży wapń jest mobilizowany z kości [11]. Ta fizjologiczna, odwracalna osteoporoza kości zanika jeszcze, gdy poroże przyrasta [12], natomiast późniejsze zrzućanie poroży może być skutkiem spadku porowatości poroży [11].

Porównując zawartości wapnia, magnezu i fosforu w kościach czaszek i porożach jeleni oraz saren, zauważono, że poziomy tych pierwiastków są bardzo zróżnicowane. Średnie stężenie wapnia w porożach jeleni było większe niż w kościach czaszek [13], podczas gdy w badaniach własnych u saren wartości te kształtowały się odwrotnie (tab. 1). Należy jednak pamiętać, że są to dwa różne gatunki, a materiał badawczy pochodził od zwierząt selekcyjnych, tzn. przeznaczonych do odstrzału, a więc chorych lub wykazujących wrodzone wady genetyczne. Do osobników starych *Nowicka* zakwalifikowała jelenie w wieku 6–8 lat, podczas gdy gatunek ten dożywa na wolności 20 lat [14]. Sarny natomiast żyją od 12–14 lat [15], a więc 8 lat jest dla nich wiekiem bardziej zaawansowanym niż dla jeleni, dla których szczyt rozwoju przypada na 12 lat [16].

Oprócz pobierania związków mineralnych bezpośrednio ze szkieletu, poroża są też w stanie akumulować substancje obce. Dzięki tej właściwości mogą być uważane za bioindykatory zanieczyszczenia środowiska. Przykładowo oznaczanie stężenia fluorków w porożu jest wygodną formą monitoringu czasowych zmian poziomu fluorków w otoczeniu, w szczególności na terenach uprzemysłowionych [17]. Poroża saren pochodzących z okolic Szczecina, a więc z rejonu silniej skażonego niż obszar Drawska Pomorskiego, zaabsorbowały więcej fluorków (ryc. 4).

Tabela 2. Zestawienie korelacji między wapniem (Ca), magnezem (Mg), fosforem (P) i fluorkami (F) w porożach (a) i kościach czaszek (b) ($p < 0,05$)

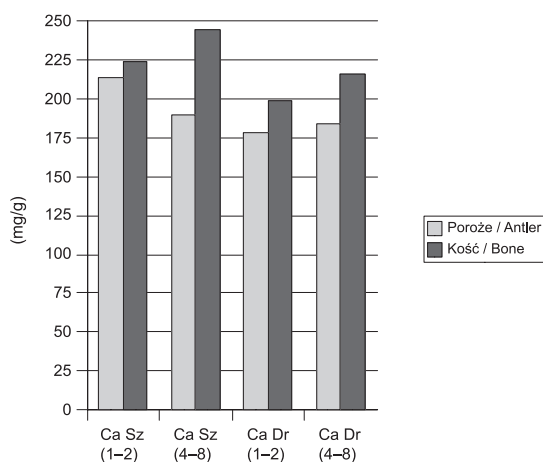
Table 2. Correlations between calcium (Ca), magnesium (Mg), phosphorus (P), and fluoride (F) in antlers (a) and skull bones (b) ($p < 0.05$)

Pierwiastek / Element	n	R Spearman	p
Ca/b & Mg/b	22	0,658950	0,000853
Ca/a & Mg/a	22	0,605872	0,002803
Mg/b & Mg/b	22	0,451158	0,035076

Tabela 3. Zestawienie współczynników kość (a)/poroże (b) dla wapnia (Ca), magnezu (Mg), fluorków (F) i fosforu (P) oraz współczynników Ca/a / P/a i Ca/b / P/b

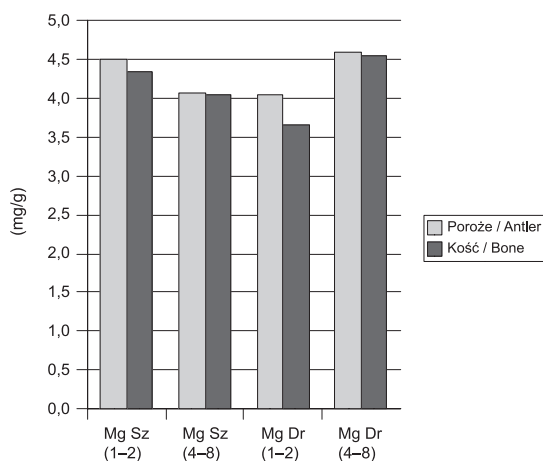
Table 3. Antler (a)/bone (b) content ratios for calcium (Ca), magnesium (Mg), fluoride (F) and phosphorus (P) together with Ca/a / P/a and Ca/b / P/b ratios

Pierwiastek / Element	Sarny młode / Roe deer-young		Sarny stare / Roe deer-old		Sarny / Roe deer	
	Szczecin	Drawsko Pom.	Szczecin	Drawsko Pom.	młode / young	stare / old
Ca/a / Ca/b	0,96	0,90	0,78	0,85	0,93	0,80
Mg/a / Mg/b	1,04	1,11	1,01	1,01	1,07	1,01
F/a / F/b	0,88	0,88	0,86	1,24	0,88	0,96
P/a / P/b	1,04	0,86	0,76	0,98	0,94	0,84
Ca/a / P/a	2,14	1,85	2,25	1,80	2,00	2,05
Ca/b / P/b	2,32	1,77	2,20	2,07	2,02	2,15



Ryc. 1. Zestawienie średniej zawartości wapnia (Ca) w porożach i kościach czaszek saren. Różnice istotne statystycznie: Ca Sz (1-2) (poroże) i Ca Sz (4-8) (poroże), $p = 0,008658$; Ca Sz (4-8) (poroże) & Ca Sz (4-8) (kość), $p = 0,027709$

Fig. 1. Mean calcium content in antlers and skull bones of roe deer. Statistically significant differences between groups: Ca Sz (1-2) (antler) & Ca Sz (4-8) (antler), $p = 0,008658$; Ca Sz (4-8) (antler) & Ca Sz (4-8) (bone), $p = 0,027709$

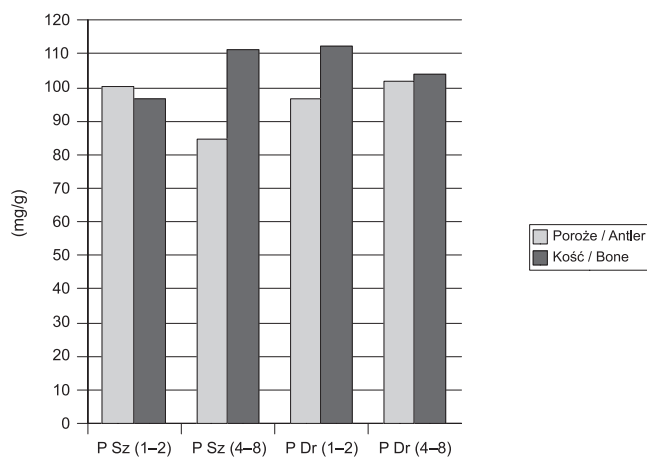


Ryc. 2. Zestawienie średniej zawartości magnezu (Mg) w porożach i kościach czaszek saren. Różnice istotne statystycznie: Mg Sz (4-8) (kość) i Mg Dr (4-8) (kość), $p = 0,019048$; Mg Dr (1-2) & Mg Dr (4-8) (kość), $p = 0,009524$

Fig. 2. Mean magnesium (Mg) content in antlers and skull bones of roe deer. Statistically significant differences between groups: Mg Sz (4-8) (bone) & Mg Dr (4-8) (bone), $p = 0,019048$; Mg Dr (1-2) & Mg Dr (4-8) (bone), $p = 0,009524$

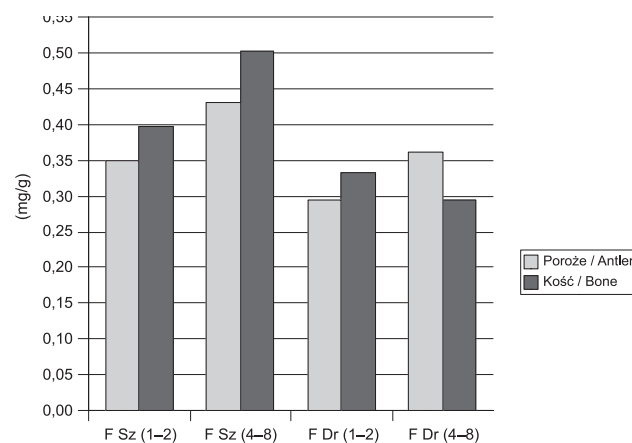
U ludzi magnez ułatwia wbudowywanie wapnia do kośćca. Pełni on także rolę aktywatora ok. 300 układów enzymatycznych, szczególnie tych, związanych z przeniesieniem grup fosforanowych i przemianami energetycznymi w komórce [18]. U saren można zauważyć podobne interakcje magnezu i wapnia. Potwierdzają to dodatnie, istotne statystycznie korelacje między tymi dwoma pierwiastkami (tab. 2).

Analizując zawartości badanych pierwiastków można stwierdzić, że poroża zawierają więcej magnezu w porównaniu do kości czołowych, natomiast ilorazy zawartości wapnia i fosforu (Ca/P) dla czaszek i poroży wynoszą ok. 2 (tab. 3). Są one nieco wyższe dla osobników starszych, co odnotowano także w porożach jeleniowatych [2]. Poza flu-



Ryc. 3. Zestawienie średniej zawartości fosforu (P) w porożach i kościach czaszek saren

Fig. 3. Mean phosphorus (P) content in antlers and skull bones of roe deer



Ryc. 4. Zestawienie średniej zawartości fluoru (F) w porożach i kościach czaszek saren. Różnica istotna statystycznie: F Sz (1-2) (kość) i F Dr (4-8) (kość), $p = 0,038095$

Fig. 4. Mean fluoride content in antlers and skull bones of roe deer. Statistically significant differences between groups: F Sz (1-2) (bone) & F Dr (4-8) (bone), $p = 0,038095$

orkami, których zawartość u saren zależała w dużej mierze od stopnia skażenia nimi środowiska naturalnego, osobniki młode charakteryzowały się nieco wyższym poziomem wapnia, magnezu i fosforu niż osobniki starsze. Przyczyną tego stanu rzeczy mógł być wiek zwierząt (najmocniejsze poroże ma kozioł 6-7-letni) [15]. Kości czaszki były nieco bardziej zmineralizowane niż wyrastające z nich poroża. Poczynione obserwacje sugerują jednak, że istnieje między nimi różnica w budowie strukturalnej. Zauważono to podczas histologicznej dekalcyfikacji obu struktur. W przypadku kości dekalcyfikacja trwała kilka dni, a usuwanie wapnia z poroży zajęło kilka miesięcy [13].

Wnioski

1. Stopień zmineralizowania poroży zależy od wieku zwierzęcia i terenu jego bytowania.

2. Mimo podobnej budowy kości i poroży pierwiastki są inaczej usytuowane w obu strukturach, wpływając na ich właściwości fizykochemiczne.

3. Poroża mogą odgrywać rolę biomarkerów skażenia środowiska fluorkami.

Piśmiennictwo

1. *Pielowski Z.*: Sarna. Wyd. Świat, Warszawa 1999.
2. *Jaczewski Z.*: Poroże jeleniowatych. Państw. Wyd. Rolnicze i Leśne, Warszawa 1981.
3. *Price J., Allen S.*: Exploring the mechanism regulating regeneration of deer antler. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2004, 359, 809–822.
4. *Kierdorf U., Kierdorf H.*: Temporal variation of fluoride concentration in antlers of roe deer (*Capreolus capreolus*) living in an area exposed to emissions from iron and steel industry, 1948–2000. *Chemosphere*, 2003, 52, 1677–1681.
5. *van der Eems K.L., Brown R.D., Gundberg C.M.*: Circulating levels of 1,25 dihydroxyvitamin D, alkaline phosphatase, hydroxyproline, and osteocalcin associated with antler growth in white-tailed deer. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 1988, 118, 407–414.
6. *Huo Y., Schirf V.R., Winters W.D.*: The differential expression of NGFS-like substance from fresh pilone antler of *Cervus nippon* Temminck. *Biomed. Sci. Instrum.* 1997, 33, 541–543.
7. *Yang H.O., Park J.S., Cho S.H., Yoon J.Y., Kim M.G., Jhon G.J. et al.*: Stimulatory effects of monoacetyldiglycerides on hematopoiesis. *Biol. Pharm. Bull.* 2004, 27, 1121–1125.
8. *Kierdorf U., Kierdorf H., Schultz M., Rolf H.J.*: Histological structure of antler in castrated male fallow deer (*Dama dama*). *Anat. Rec. A. Discov. Moll. Cell. Evol. Biol.* 2004, 281, 1352–1362.
9. *Piotrowska S.*: Zrzucanie i odbudowa poroża zwierzyny płowej ciekawym zjawiskiem biologicznym. *Wszechświat*, 2005, 106, 144–148.
10. *Goss R.J.*: Tumor-like growth of antler in castrated fallow deer: an electron microscopic study. *Scanning Microsc.* 1990, 4, 715–720.
11. *Brockstedt Rasmussen H., Sorensen P.L., Ewald H., Melsen F.*: The rhythmic relation between antler and bone porosity in Danish deer. *Bone*, 1987, 8, 19–22.
12. *Baxter B.J., Andrews R.N., Barrell G.K.*: Bone turnover associated with antler growth in red deer (*Cervus elaphus*). *Anat. Rec.* 1999, 256, 14–19.
13. *Nowicka W., Machoy Z., Gutowska I., Nociń I., Piotrowska S., Chlubek D.*: Contents of calcium, magnesium, and phosphorus in antlers and cranial bones of the European red deer (*Cervus elaphus*) from different regions in western Poland. *Pol. J. Environ. Stud.* 2006, 15, 297–301.
14. <http://www.lowiecki.pl/gdansk/wybrzeze/images/zwierzyna/jelen/jelen.html>
15. <http://www.lowiecki.pl/gdansk/wybrzeze/images/zwierzyna/sarna/sarna.html>
16. <http://www.wolinpn.pl/html/przyroda/fauna/ssaki/monografie/jelen/zycie.html>
17. *Samujło D., Machoy-Mokrzyńska A., Dąbkowska E., Nowicka W., Paterkowski W.*: Fluoride accumulation in European deer antlers. *Environ. Sci.* 1994, 2, 189–194.
18. *Odrowąż-Sypniewska G., Pater A., Gruszka M.*: Rola magnezu w ustroju. *In vitro Explorer*, 2005, 1, 8–10.

WIESŁAW SALICKI, ELŻBIETA KALISIŃSKA

STĘŻENIA FLUORU I WAPNIA W KOŚCIACH GRZYWACZA Z OKOLIC SZCZECINA W LATACH 2002–2004*

FLUORINE AND CALCIUM CONCENTRATIONS IN BONES OF THE WOOD PIGEON FROM THE ENVIRONS OF SZCZECIN: A 2002–2004 STUDY*

Katedra Zoologii Akademii Rolniczej w Szczecinie
ul. Doktora Judyma 20, 71-466 Szczecin
Kierownik: prof. dr hab. Elżbieta Kalisińska

Summary

Material and methods: This study was done in 176 wood pigeons (*Columba palumbus*). In 2002, assays were performed on 24 immature (imm) and 66 adult (ad) individuals. In 2003, 15 immature birds could be assayed, while the 2004 sample consisted of a total of 71 individuals (12 imm and 59 ad). Pigeons were caught near the villages of Skarbimierzyce and Dołuje situated west of Szczecin.

Fluorine and calcium content in ash and dry mass of the wood pigeon's tarsometatarsus bones was determined. Fluorine content in ash and dry mass increased with age of the bird. It was only in 2002 samples that significant differences between immature and adult pigeons in calcium ash content were detected. Analysis of variance (ANOVA) failed to reveal significant differences between 2002 and 2004 samples in calcium content of adult bone ash. The remaining parameters in this group of birds differed significantly. The immature group showed no significant differences between 2002 and 2004 samples in fluorine content of bone ash and dry mass. Significant differences ($p \leq 0.01$) in fluorine content were revealed between 2002 and 2003 as well as between 2003 and 2004 samples. Ash calcium content showed no differences for immature birds of 2002 and 2003; however, significant differences ($p \leq 0.001$) were revealed between 2002 and 2004 as well as between 2003 and 2004. No significant differences were revealed between the immature bone dry mass calcium contents in 2002 and 2003 as well as in 2002 and 2004; on the other hand, the

difference between the 2003 and 2004 data proved significant ($p \leq 0.05$).

Results: The present study demonstrated a number of differences in fluorine and calcium content in bones of the plant-eating wood pigeon. In addition, fluorine was found to undergo an intense age-related accumulation in bones. Fluorine content showed marked year-to-year variability.

Conclusions: It is highly probable that fluorine content in wood pigeon bone reflects environmental fluorine contamination from industrial plants in Szczecin and its environs which are the major source of fluorine emissions.

Key words: fluorine – calcium – bones – birds – wood pigeon – biomonitoring.

Streszczenie

Material i metody: Do badań wykorzystano 176 gołębi z gatunku grzywacz *Columba palumbus*. W roku 2002 ułożono 24 młode osobniki (im) i 66 dorosłych osobników (ad). W następnym roku – 2003 zgromadzono 15 młodych osobników, a w roku 2004 – łącznie 71 grzywaczy (12 im i 59 ad). Ptaki pochodziły z okolic dwóch miejscowości Skarbimierzyce i Dołuje, położonych po zachodniej stronie Szczecina.

Zbadano stężenie fluoru i wapnia w odniesieniu do popiołu i suchej masy kości nóg (*tarsometatarsus*) grzywacza. Zaobserwowano wzrost zawartości fluoru w popiele

* Praca zrealizowana w ramach projektu badawczego nr 2P04G02027 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych.

* Supported by a grant № 2P04G02027 from the State Committee for Scientific research, Poland.

i w suchej masie kości wraz z ich wiekiem. Tylko w roku 2002 istotnie różniły się stężenia wapnia w popiele między osobnikami młodymi i dorosłymi. Analiza wariancji (ANOVA) nie wykazała istnienia różnic w zakresie zawartości wapnia w popiele u dorosłych grzywaczy, pochodzących z lat 2002 i 2004. Pozostałe badane parametry w tej grupie ptaków różniły się istotnie. W grupie młodych ptaków nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości fluoru w popiele i suchej masie kości pomiędzy latami 2002 i 2004, natomiast pomiędzy latami 2002 i 2003 oraz 2003 i 2004 różniły się one istotnie ($p \leq 0,01$). W odniesieniu do wapnia w popiele nie zaobserwowano różnic u młodych osobników jedynie w latach 2002 i 2003. Pomiedzy latami 2002 i 2004 oraz 2003 i 2004 różniły się pod tym względem istotnie ($p \leq 0,001$). Zawartością wapnia w suchej masie kości młode gołębie nie różniły się w latach 2002 i 2003 oraz 2002 i 2004, jedynie w latach 2003 i 2004 wykryto istotną różnicę ($p \leq 0,05$) w zakresie tego parametru.

Wyniki: Niniejsze badania wykazały istnienie wielu różnic w stężeniach fluoru i wapnia w kościach roślinożernych grzywaczy, przy czym wykazano intensywną kumulację fluoru wraz z wiekiem tych ptaków w ich kościach i dużą zmienność jego zawartości w poszczególnych latach.

Wnioski: Jest wysoce prawdopodobne, że zawartość fluoru w kościach grzywaczy odzwierciedla stan zanieczyszczenia środowiska tym pierwiastkiem, a jego zasadniczym źródłem są zakłady przemysłowe w Szczecinie i w jego okolicy.

H a s ł a: fluor – wapń – kości – ptaki – grzywacz – biomonitoring.

Wstęp

Charakterystyczną cechą biomonitoringu z użyciem roślin jest to, że można przy ich pomocy określić wpływ substancji zanieczyszczających w czasie, natomiast przy użyciu zwierząt w czasie i przestrzeni [1].

Uważa się, że zwierzęta wykorzystywane jako biomonitory powinny charakteryzować się: reprezentatywnością przestrzenną (gatunek powinien być możliwie najbardziej rozpowszechniony, liczny, przywiązany do badanego środowiska), powinny cechować się również dostępnością, czyli możliwością pozyskiwania do badań okazów odpowiednich jakościowo (potwierdzonych eksperymentalnie w kontrolowanych warunkach testami dawka – odpowiedź), muszą wystarczać ilościowo do opracowań statystycznych, zwierzęta te muszą być długowieczne, aby zmiany w czasie badanych parametrów mogły być powtarzane na tych samych osobnikach, a także powinny charakteryzować się reprezentatywnością ekologiczną (dobrze znaną fizjologią, możliwie podobną do ludzkiej, możliwością rozpoznawania wieku i płci, wrażliwością i odpornością na badane zanieczyszczenia), a także rozpoznawalnym miejscem w poziomie troficznym i rolą w ekosystemie, powtarzalnością procedur

kolekcjonowania próbek [1]. W większości takimi cechami charakteryzują się ptaki, a ich dodatkowymi zaletami są: łatwość identyfikacji i klasyfikacji, dobrze poznana biologia i ekologia, zajmowanie przez określone gatunki różnych pozycji w łańcuchu troficznym, możliwość pobierania próbek metodami, które nie wymagają zabijania (skorupy jaj, pióra), długowieczność, obecność wielu gatunków w różnych ekosystemach, krajach, a nawet na wielu kontynentach, mobilność, która pozwala na ocenę zmian przestrzennych środowiska, duże społeczne zainteresowanie ptakami, pozwalające na zebranie przez obserwatorów wielu danych o ich liczebności i stanie populacji. Jednocześnie zwraca się uwagę na ograniczenia w zastosowaniu ptaków jako biomonitorów. Ich długowieczność może powodować trudności w ocenie krótkoterminowych zmian środowiska. Charakterystyczne dla wielu gatunków migracje na dużych obszarach mogą komplikować obraz zmian w badanym środowisku, utrudniając właściwą interpretację otrzymanych wyników. Zbyt wiele czynników powoduje zmienność w wielkości populacji i jej strukturze wiekowej, aby móc oceniać wpływ badanego czynnika. Eksperymentalne badania wpływu substancji zanieczyszczającej na badany gatunek dziko żyjącego ptaka jest ograniczony. Wprowadzona w wielu krajach świata ścisła ochrona znacznej liczby gatunków ptaków, a także ich siedlisk, mocno ogranicza pozyskiwanie ich do celów badawczych [2, 3].

Obszerne, przeglądowe publikacje podejmujące temat biomonitoringu z wykorzystaniem ptaków określają możliwości obserwacji wielu zmian w środowisku [2, 3]. Powstały liczne prace, w których badano różne ksenobiotyki w tkankach i narządach, obserwowano zmiany w strukturze populacji ptaków bytujących w rozmaitych ekosystemach, a ich celem była ocena skażenia środowiska.

Eksperymentalnie udowodniono przydatność kości i skorup jaj ptasich do celów monitoringu zanieczyszczenia środowiska fluorem [4, 5, 6, 7, 8]. Jednak podjęto jedynie tylko nieliczne próby, oparte na badaniach terenowych.

Celem niniejszej pracy było zbadanie różnic w stężeniach fluoru i wapnia w kościach grzywaczy pochodzących z polowań, które odbyły się na tym samym terenie w trzech kolejnych latach oraz oceny przydatności tych ptaków do celów biomonitoringowych w zakresie zanieczyszczenia środowiska związkami fluoru.

Materiał i metody

Materiałem badawczym był grzywacz *Columba palumbus* (rząd gołębiowe *Columbiformes*, gromada ptaki *Aves*), pochodzący z polowań, które odbywały się w drugiej połowie sierpnia, w latach 2002, 2003 i 2004. Terenem łowieckim były okolice miejscowości Skarbimierzyce i Dołuje, położone po zachodniej stronie Szczecina (ryc. 1). W 2002 r. upolowano 90 gołębi w tym 24 osobniki młode i 66 dorosłych. W 2003 r. pozyskano jedynie 15 młodych osobników, a w 2004 r. łącznie 71 grzywaczy (12 młodych

i 59 dorosłych). Na podstawie stanu upierzenia i rozwoju gonad wszystkie badane ptaki podzielono na dwie grupy wiekowe: młode (w pierwszym roku życia) i dorosłe (mające więcej niż jeden rok).

Upolowane przez myśliwych ptaki były przechowywane do czasu wykonania sekcji w zamrażarce (w temperaturze poniżej -20°C). Podczas sekcji wypreparowano kości skokowe (*tarsometatarsus*) obu nóg ptaków i po dokładnym ich oczyszczeniu z tkanek miękkich przeznaczono je do dalszej obróbki laboratoryjnej.

Brak ogólnie przyjętych metod przygotowania próbek materiału biologicznego do badań zawartości fluoru, jako etapu w dużej mierze decydującego o wartościach bezwzględnych wyników analiz, zdecydował o przyjęciu metod najczęściej stosowanych przez innych autorów, zajmujących się oznaczaniem fluoru w kościach ptaków [8, 9, 10, 11, 12].



Ryc. 1. Miejsce pozyskania materiału badawczego

Fig. 1. Area of wood pigeon hunting

Zawartość suchej masy w kościach oznaczono metodą wagową. Rozmrożone kości suszono w temperaturze 105°C do stałej masy. Następnie kości spalano w piecu elektrycznym w temperaturze 700°C w czasie 8 godzin.

Z każdej spopielonej i dokładnie zmielonej kości odważono dwie próbki (każda po 100 mg), które rozpuszczono w 5 mL roztworu kwasu nadchlorowego o stężeniu 1,13 mol/L [8], a następnie dodano 50 mL 0,2 mol/L roztworu cytrynianu sodowego i uzupełniono do 100 mL podwójnie destylowaną wodą. Przed każdym oznaczeniem korygowano wartość pH roztworem kwasu nadchlorowego

lub wodorotlenku sodowego do 5,50. Oznaczenie stężenia fluoru w próbce kości wykonywano przy użyciu fluorkowej elektrody jonoselektywnej (Detektor) oraz jonometru CX-731 (Elmetron). Jako elektrodę odniesienia do pomiaru różnicy potencjału zastosowano elektrodę chlorosrebrową z płaszczem zewnętrznym zawierającym 1 mol/L roztwór KNO_3 . Za wynik przyjmowano średnią z dwóch prób pochodzących z tej samej kości i przedstawiono ją jako zawartość fluoru wyrażoną w miligramach na kilogram popiołu lub, po przeliczeniu, na kilogram suchej masy.

Oznaczanie wapnia w popiele z kości wykonano stosując metodę ICP EAS na aparacie Perkin-Elmer Optima 2000 DV. W tym celu rozpuszczano w 1 mol/L roztworze kwasu azotowego naważki popiołu kostnego i metodą rozcieńczeń dopasowywano stężenie wapnia do czułości aparatu.

Wszystkie badane okazy ptaków podzielono pod względem wieku oraz lat pozyskania. Dla każdego badanego parametru i dla wszystkich grup badanych ptaków zastosowano następujące charakterystyki statystyk podstawowych: średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe, wartość minimalną i maksymalną oraz medianę.

Obliczenia statystyczne wykonano przy pomocy programu Statistica 6.0. Do oceny zgodności rozkładu otrzymanych wyników z oczekiwanym rozkładem normalnym zastosowano test W Shapiro–Wilka. Ponieważ większość rozkładów badanych zmiennych różniła się od rozkładu normalnego, do porównań średnich zastosowano nieparametryczny test U Manna–Whitneya. W obrębie poszczególnych lat pozyskania ptaków dokonano porównań oznaczonych parametrów oddzielnie w odniesieniu do młodych i dorosłych osobników.

Sprawdzono istotność korelacji rang Spearmana (r_s) pomiędzy stężeniem fluoru i wapnia w popiele oraz w suchej masie kości, a także pomiędzy wiekiem i badanymi parametrami kości. Do badania, czy istnieją różnice pomiędzy wielkościami analizowanych parametrów ustalonymi dla gołębi z różnych lat, zastosowano analizę wariancji ANOVA oraz *post hoc* test Tukeya. Analizę wariancji przeprowadzono osobno dla osobników młodych i dorosłych [13].

Wyniki

Uzyskane wyniki, dotyczące stężeń fluoru i wapnia w popiele i suchej masie kości zestawiono w tabeli 1.

Wyliczone średnie wartości stężeń fluoru w popiele kości badanych osobników młodych, dorosłych i wszystkich grzywaczy (bez podziału na grupy wiekowe) wyniosły odpowiednio 748, 1800 i 1495 mg F/kg.

Zarówno w odniesieniu do popiołu, jak i do suchej masy kości największe średnie stężenia fluoru stwierdzono u dorosłych grzywaczy w 2002 r., a najmniejsze u młodych osobników pochodzących z 2003 r. Największe średnie stężenie wapnia w popiele i suchej masie kości wystąpiło u dorosłych grzywaczy upolowanych w 2004 r., a najmniejsze u młodych ptaków z roku 2003.

Tabela 1. Średnie stężenia (A), odchylenia standardowe (SD), zakresy zmienności (min.–max.) fluoru i wapnia w kościach grzywaczy pochodzących z różnych lat oraz wartości testów U Manna–Whitneya i odpowiednie korelacje Spearmana (r_s)

Table 1. Mean concentrations (A), standard deviation (SD), min.–max. ranges for fluoride and calcium in bones of the wood pigeon from 2002–2004; results of Mann–Whitney U-test and Spearman's rank correlation (r_s)

Rok Year	Wiek Age	n	Stężenia w popiele Concentration in ash		Korelacja r_s F–Ca w popiele Correlation r_s F–Ca in ash	Stężenia w suchej masie Concentration in dry mass		Korelacja r_s F–Ca w suchej masie Correlation r_s F–Ca in dry mass
			fluor / fluorine mgF/kg A ± SD (min.–max.)	wapń / calcium gCa/kg A ± SD (min.–max.)		fluor / fluorine mgF/kg A ± SD (min.–max.)	wapń / calcium gCa/kg A ± SD (min.–max.)	
2002	im	24	844 ± 333 (309–1644)	372,6 ± 6,9 (357,8–387,0)	NS	381 ± 156 (148–759)	168,7 ± 15,7 (139,4–195,1)	NS
	ad	66	1925 ± 631 (803–4855)	381,8 ± 12,3 (358,5–425,3)	NS	882 ± 316 (350–2218)	173,7 ± 17,6 (138,1–208,5)	0,54 p ≤ 0,01
Test U im–ad			6,66 p ≤ 0,0001	3,52 p ≤ 0,001		6,54 p ≤ 0,0001	NS	
2003	im	15	478 ± 213 (101–717)	371,9 ± 7,8 (359,6–384,1)	NS	198 ± 86 (41–313)	155,6 ± 10,3 (138,6–174,9)	NS
2004	im	12	893 ± 417 (65–1611)	398,5 ± 14,4 (374,3–436,3)	0,66 p ≤ 0,05	391 ± 176 (23–625)	174,1 ± 25,7 (130,2–225,5)	0,28 p ≤ 0,05
	ad	59	1660 ± 830 (415–4343)	400,6 ± 8,1 (392,7–443,4)	NS	733 ± 372 (159–1994)	176,7 ± 15,7 (142,7–210)	NS
Test U im–ad			3,21 p ≤ 0,01	NS		3,27 p ≤ 0,01	NS	

ad – dorosłe / adult; im – młode / immature; n – liczba przypadków / number of birds; NS – różnice nieistotne / not significant

Tabela 2. Wartości współczynników (r_s) i istotności korelacji (p) rang Spearmana pomiędzy wiekiem grzywacza i badanymi parametrami ich kości w poszczególnych latach

Table 2. Spearman's rank correlation coefficients (r_s) and their significance levels (p) for wood pigeon age vs. bone parameters analysed in 2002 and 2004

Badana korelacja Correlation	2002		2004	
	r_s	p	r_s	p
Wiek – F w popiele / Age vs F in ash	0,71	0,01	0,38	0,01
Wiek – Ca w popiele / Age vs Ca in ash	0,37	0,01	NS	
Wiek – F w suchej masie / Age vs F in dry mass	0,69	0,01	0,39	0,01
Wiek – Ca w suchej masie / Age vs Ca in dry mass	NS		NS	

NS – wartość nieistotna / non-significant correlation

W latach 2002 i 2004, kiedy użyto do badań młode i dorosłe osobniki grzywacza zaobserwowano wzrost zawartości fluoru w popiele i suchej masie kości wraz z ich wiekiem. Średnie stężenia fluoru w kościach dorosłych osobników były 2,3 oraz 1,9 razy większe (odpowiednio w roku 2002 i 2004) w porównaniu do młodych grzywaczy. Spostrzeżenie to zostało potwierdzone badaniem korelacji rang Spearmana, które przedstawiono w tabeli 2. Stwierdzono istotną korelację pomiędzy wiekiem ptaków a stężeniami fluoru w popiele i w suchej masie kości.

Najmniejsze średnie stężenie wapnia zarówno w odniesieniu do popiołu, jak i do suchej masy kości stwierdzono w przypadku młodych grzywaczy w 2003 r., a największe u osobników dorosłych z roku 2004. Stężenia wapnia w popiele między osobnikami młodymi i dorosłymi istotnie różniły się jedynie w 2002 roku (tab. 1).

Tylko w jednym roku (2002) w popiele z kości grzywaczy odnotowano istotną korelację pomiędzy wiekiem i stężeniem wapnia (tab. 2).

Silną, dodatnią korelację pomiędzy średnim stężeniem fluoru i wapnia w odniesieniu do suchej masy kości stwierdzono u dorosłych grzywaczy w roku 2002. Słabszą, ale również istotną korelację wykryto pomiędzy badanymi pierwiastkami (w odniesieniu do popiołu i suchej masy) u młodych ptaków w 2004 r. (tab. 1).

Analiza wariancji wykazała istnienie różnic pomiędzy zawartością fluoru w popiele i suchej masie oraz wapnia w popiele z kości, w przypadku osobników dorosłych, między latami 2002 a 2004 (tab. 3).

Test Tukeya zastosowany do porównań stężeń poszczególnych parametrów kości młodych osobników grzywacza, analizowanych na przestrzeni trzech lat, wykazał istnienie różnic między stężeniami fluoru w popiele i w suchej masie kości pomiędzy osobnikami pochodzącymi z lat 2002 i 2003 oraz 2003 i 2004. Stężeniem wapnia w popiele kości różniły się młode grzywacze w latach 2002 i 2004 oraz 2003 i 2004, a jedyną różnicę w zawartości wapnia w suchej masie kości badanych ptaków stwierdzono między latami 2003 i 2004 (tab. 4).

Dyskusja

Grzywacze należą do grupy ptaków na Pomorzu Zachodnim, które są najbardziej przywiązane do swych siedlisk [14]. Ich egzystencja w bliskim sąsiedztwie terenów uprzemysłowionych wiąże się z narażeniem na antropogeniczne zanieczyszczenia, w tym również fluorem.

Tabela 3. Porównania (metodą ANOVA) badanych parametrów kości młodych i dorosłych grzywaczy pochodzących z różnych lat

Table 3. Comparisons (ANOVA testing) of bone parameters studied in immature and adult wood pigeons in 2002–2004

Badany parametr Bone parameters studied	Młode (z 3 lat) Immature (from 3 years)		Dorośle (z 2 lat) Adult (from 2 years)	
	F	p	F	P
Fluor w popiele fluorine in ash	7,36	0,01	4,09	0,05
Wapń w popiele calcium in ash	35,66	0,0001	98,03	0,0001
Fluor w suchej masie fluorine in dry mass	8,80	0,001	5,82	0,05
Wapń w suchej masie calcium in dry mass	4,28	0,05	NS	NS

F – wartość statystyki / test statistic; NS – różnica nieistotna / non-significant difference; p – poziom istotności / significance level

Tabela 4. Istotność różnic, według testu Tukeya, porównań między młodymi osobnikami grzywaczy pochodzących z różnych lat w zakresie badanych parametrów ich kości

Table 4. Results of Tukey's test for significance of differences in bone parameters studied in the immature wood pigeons in 2002–2004

Badany parametr Bone parameters studied	Lata / Years		
	2002–2003	2002–2004	2003–2004
Fluor w popiele fluorine in ash	0,01	NS	0,01
Wapń w popiele calcium in ash	NS	0,001	0,001
Fluor w suchej masie fluorine in dry mass	0,01	NS	0,01
Wapń w suchej masie calcium in dry mass	NS	NS	0,05

NS – różnica nieistotna / non-significant difference

Badania wpływu zanieczyszczenia środowiska związkami fluoru, pochodzącymi ze źródeł naturalnych i antropogenicznych, dowodzą silnej kumulacji tego pierwiastka w kościach stałocieplnych kręgowców [15, 16, 17, 18, 19, 20, 21]. Nieliczne badania dotyczące narażenia ptaków na zwiększone dawki fluoru pochodzące ze źródeł antropogenicznych wykazały bardzo silną kumulację tego pierwiastka w ich kośćcu. Podobne zjawisko zaobserwowano w przypadku badanych w niniejszej pracy grzywaczy. Henny i Burke [10] wykazali istotne różnice pomiędzy stężeniami fluoru u ślepowronów *Nycticorax nycticorax* reprezentujących różne grupy wiekowe. Według nich, zawartość fluoru w kościach ptaków wyraźnie wzrasta wraz z wiekiem. Badane przez *Stewart i wsp.* [22] czaple białolicie pochodzące z niezanieczyszczonych terenów Nowej Zelandii oraz opisywane w niniejszej pracy grzywacze, w każdej z grup wiekowych, charakteryzowały się stężeniem fluoru w kościach, który nie przekraczał 2200 mg F/kg popiołu. Poniżej tej wartości *Henny i Burke* [10] odnotowali stężenie fluoru jedynie w najmłodszej grupie samców ślepowrona. Można więc przypuszczać, że ośrodki przemysłowe emitujące fluor powodują gwałtowny

wzrost zawartości fluoru w kościach ptaków bytujących w ich pobliżu.

Badaniem zależności pomiędzy stężeniem fluoru w kościach ptaków a zanieczyszczeniem środowiska przez jego związki, emitowanymi z hut aluminium w Norwegii, zajmowali się *Vikøren i Stuve* [11, 12]. Analizowali oni zawartość fluoru w kościach bernikli kanadyjskiej *Branta canadensis* upolowanej w okolicach dwóch hut aluminium i na terenie niezanieczyszczonym [11]. Jednakże nie określili oni wieku badanych przez siebie bernikli (rząd blaszkodziobe, gęsi). Ponad dwukrotnie większe, istotnie różniące się stężenia fluoru stwierdzono w kościach gęsi pochodzących z terenu zanieczyszczonego A w stosunku do bernikli pochodzących z terenu zanieczyszczonego B i niezanieczyszczonego. *Vikøren i Stuve* [11] konkludują, że bernikla kanadyjska nie jest dobrym bioindykatorem skażenia środowiska fluorem. Wniosek ten powinien być zrewidowany, ponieważ badania pozostałych, wcześniej cytowanych autorów i badania własne, wskazują na wyraźny związek pomiędzy wiekiem a stężeniem fluoru w kościach ptaków. Porównując średnie stężenie fluoru w kościach wszystkich, bez podziału na wiek badanych grzywaczy w niniejszej pracy, ze średnim stężeniem fluoru w kościach bernikli pochodzących z terenu niezanieczyszczonego, które były analizowane przez *Vikørena i Stuvego* [11], uzyskuje się niemal identyczne wartości. Wartości średnich stężeń fluoru w popiele z kości grzywaczy, bernikli pochodzącej z terenu zanieczyszczonego B i niezanieczyszczonego, wynoszą odpowiednio – 1495, 1344 i 1450 mg F/kg. Należy dodać, że oba porównywane gatunki są roślinożerne.

W pracy *Tunera i wsp.* [9], w której nie określono wieku i płci ptaków, biorąc pod uwagę jedynie przynależność gatunkową, zbadano zależność wpływu miejsca bytowania ptaków na wielkość stężenia fluoru w ich kościach. Porównano stężenia fluoru w kościach ptaków pochodzących z trzech terenów uprzemysłowionych i czterech nieuprzemysłowionych, umiejscowionych w Nowej Zelandii, przy ujściach rzek do morza. Zbadano pięć gatunków ptaków. Jedyną statystycznie istotną różnicę odnotowano pomiędzy średnimi zawartościami fluoru w kościach mewy czerwonodziobej *Larus novaehollandiae scopulinus* i modrzyka ciemnego *Porphyrio melanotus* ($p \leq 0,01$). Różnica ta, jak sugerują *Tuner i wsp.* [9], spowodowana jest różną dietą tych gatunków. Mewa czerwonodzioba odżywia się drobnymi rybami, makroplanktonem, odpadkami z plaż, owadami i ślimakami z pól uprawnych, a modrzyk ciemny odżywia się roślinami, owadami i ptasimi jajami. Podobne różnice odnotowali w swojej pracy *Stewart i wsp.* [22]. *Tuner i wsp.* [9] nie stwierdzili żadnych istotnych różnic pomiędzy zawartością fluoru w kościach osobników tych samych gatunków egzystujących w warunkach terenów uprzemysłowionych i nieuprzemysłowionych. Cytowana już praca *Turnera i wsp.* [9] jest jedyną dostępną publikacją, w której materiał uzyskany od ptaków wykorzystano do celów bioindykacyjnych zanieczyszczenia środowiska fluorem w tak szerokim aspekcie. Autorzy ci wskazują jednak na konieczność określania

wieku badanych ptaków ze względu na znaczne różnice w stężeniach fluoru, które występują pomiędzy osobnikami tego samego gatunku w różnym wieku.

Rola wapnia w fizjologii ptaków jest nie do przecenienia. Zmienność zawartości tego pierwiastka w kościach samic związana jest przede wszystkim z reprodukcją. Podczas okresów nieśności może dochodzić do poważnego ubytku zawartości tego pierwiastka w kościach samic. Stałe dostarczanie ptakom wapnia w pokarmie może je uchronić przed jego utratą z tkanki kostnej [23, 24]. Dorosłe osobniki grzywaczy (w wieku reprodukcyjnym), które są przedmiotem badań niniejszej pracy mogły w sierpniu wyprowadzać jeszcze ostatnie lęgi. Jest więc wysoce prawdopodobne, że zmniejszenie uwapnienia kości, które mogło być spowodowane okresem reprodukcyjnym, już minęło i nastąpił istotny ($p \leq 0,001$) wzrost zawartości tego pierwiastka w kościach dorosłych osobników – tak było w roku 2002. Zaobserwowano podobny, ale niepotwierdzony statystycznie wzrost zawartości wapnia u dorosłych ptaków również w roku 2004.

Zależności pomiędzy ilością przyjmowanego z pokarmem fluoru a mineralnym składem kości badali Chan i wsp. [25], Fleming i wsp. [6] oraz Bird i wsp. [8]. Eksperyment Chana i wsp. [25] polegał na podawaniu przepiórkom japońskim *Coturnix japonica*, przez 11 dni po wylęgu, pokarmu zawierającego 1,2% Ca, 1,2% Ca + 0,075% F, 0,4% Ca i 0,4% Ca + 0,075% F. Małe stężenie wapnia (0,4%) w pokarmie spowodowało 23% redukcję masy ciała i 38% obniżenie zawartości popiołu w kościach w porównaniu do przepiórek karmionych dietą zawierającą trzykrotnie więcej wapnia (1,2%). Dodatek fluoru do niskowapniowej diety spowodował wzrost wiązania wapnia w kościach ptaków, powodując zwiększenie zawartości popiołu w kościach i szybsze tempo wzrostu przepiórek. W pracy Salickiego i Kalisińskiej [26] wykazano w przypadku grzywaczy istnienie silnej korelacji ($r = 0,95$; $p \leq 0,0001$; $n = 90$) pomiędzy zawartością popiołu i wapnia w suchej masie kości.

Drugi eksperyment [25] polegał na karmieniu przez kolejne 35 dni dietami, opisanymi w pierwszym eksperymencie, grupy przepiórek, której podawano wcześniej pokarm niskowapniowy. Nie zauważono istotnych różnic w zawartości popiołu w kościach osobników karmionych paszą bez dodatku fluoru. Przy zastosowaniu diet zawierających 1,2 i 0,4% Ca, zawartość popiołu wyniosła odpowiednio 57 i 58%. Większe zawartości popiołu zaobserwowano stosując diety o takiej samej zawartości wapnia, ale z dodatkiem fluoru, odpowiednio dla diet 1,2% Ca + F i 0,4% Ca + F zawartość popiołu wyniosła 62 i 61%. Stwierdzono istotne różnice ($p \leq 0,05$) pomiędzy zawartościami popiołu w kościach przepiórek karmionych paszą o zawartości 1,2% Ca i zawierającą 1,2% Ca + F. Podobnie istotną różnicę ($p \leq 0,05$) odnotowano pomiędzy zawartościami popiołu w kościach przepiórek, którym podawano paszę o zawartości 0,4% Ca i 0,4% Ca + F.

Badania radiologiczne, przeprowadzone przez tych samych badaczy [25], wykazały znaczny przyrost osteonów w kościach przepiórek karmionych paszą z dodatkiem fluoru,

co spowodowało zmniejszenie sprężystości kości i zwiększoną o 30% podatność na złamania. Eksperyment ten dowiódł, że w okresie rozwojowym ptaków istotną rolę w budowie kości odgrywa ilość dostarczanego w pokarmie wapnia. Zwiększone dawki wapnia i dodatek fluoru w podawanej paszy powodują wzrost gęstości kości, ale jednocześnie pogarszają ich właściwości mechaniczne. Zjawisko częstych złamań kości ustrzelonych ptaków, spadających z wysokości, obserwowano u badanych w tej pracy grzywaczy. Może to sugerować zbyt dużą zawartość fluoru w pokarmie młodych osobników, lub wyjątkowo małą podaż wapnia w czasie ich rozwoju.

Wieloletnie monitorowanie środowiska województw północno-zachodnich, za pomocą zwierzyny płowej wykazuje dużą zawartość fluoru w tkance kostnej badanych ssaków [27, 28, 29], relatywnie większe niż w innych regionach Polski, na przykład z rejonu Białegostoku [30]. Wykazano również, że odległość od źródła emisji fluoru ma istotny wpływ na jego zawartość w kościach zwierzyny płowej, na terenie województw zachodniopomorskiego i lubuskiego, przy czym bardziej narażone na wpływ fluoru okazały się zwierzęta pochodzące z województwa lubuskiego [31, 32]. Pierwsze próby monitorowania zanieczyszczenia okolic Szczecina fluorem z wykorzystaniem dzikich ptaków zostały podjęte w Katedrze Zoologii Akademii Rolniczej w Szczecinie [26, 33], a ich kontynuacja może dostarczyć wielu cennych informacji z tego zakresu.

Wnioski

1. Stężenia fluoru w kościach badanych grzywaczy istotnie różnią się pomiędzy osobnikami młodymi i dorosłymi. Spostrzeżenie to potwierdzają wyniki badań innych autorów.
2. Statystycznie istotne różnice zawartości fluoru w kościach badanych ptaków, w poszczególnych latach świadczą o dużej zmienności zawartości tego pierwiastka w środowisku Szczecina i jego okolic.
3. Najcenniejsze wydają się spostrzeżenia dotyczące młodych grzywaczy, ponieważ osobniki te w okresie rozwojowym są ściśle związane z badanym obszarem.
4. Duża zawartość fluoru w kościach młodych ptaków, powiększająca się około dwukrotnie w ciągu pierwszych miesięcy życia oraz mała zawartość wapnia w roślinnym pokarmie, mogą powodować zwiększoną łamliwość kości grzywaczy.
5. Zmienność przestrzenna i czasowa obecności fluoru w różnych elementach środowiska terenów północno-zachodniej Polski wymaga stałej obserwacji, opartej również na bioindykacji.

Piśmiennictwo

1. Tataruch F., Kierdorf H.: Mammals as biomonitors. In: Bioindicators and biomonitors. Eds: B.A. Markerl, A.M. Breure, H.G. Zechmeister. Elsevier Science Ltd. 2003.

2. *Becker P.H.*: Biomonitoring with birds. In: Bioindicators and biomonitors. Eds: B.A. Markerl, A.M. Breure, H.G. Zechmeister. Elsevier Science Ltd. 2003.
3. *Furness R.W., Greenwood J.J.D., Jarvis P.J.*: Can birds be used to monitor the environment? In: Birds as monitors of environmental change. Eds: R.W. Furness, J.J.D. Greenwood. Chapman & Hall, London, 1993, 1–41.
4. *Bird D.M., Massari C.*: Effects of dietary sodium fluoride on bone fluoride levels and reproductive performance of captive American kestrels. *Environ. Pollut.* 1983, 31, 67–76.
5. *Hoffman D.J., Pattee O.H., Wiemeyer S.N.*: Effects of fluoride on screech owl reproduction: teratological evaluation, growth, and blood chemistry in hatchlings. *Toxicol. Lett.* 1985, 26, 19–24.
6. *Fleming W.J., Grue C.E., Schuler C.A., Bunck C.M.*: Effects of oral doses of fluoride on nestling European starlings. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1987, 16, 483–489.
7. *Pattee O.H., Wiemeyer S.N., Swineford D.M.*: Effects of dietary fluoride on reproduction in eastern screech-owls. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1988, 17, 213–218.
8. *Bird D.M., Carrière D., Lacombe D.*: The effect of dietary sodium fluoride on internal organs, breast muscle, and bones in captive American kestrels (*Falco sparverius*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1992, 22, 242–246.
9. *Turner J.C., Solly S.R.B., Mol-Krijnen J.C.M., Shanks V.*: Organochlorine, fluorine, and heavy-metal levels in some birds from New Zealand estuaries. *N.Z. J. Sci.* 1978, 21, 99–102.
10. *Henny C.J., Burke P.M.*: Fluoride accumulation and bone strength in wild black-crowned night-herons. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1990, 19, 132–137.
11. *Vikoren T., Stuve G.*: Bone fluorine concentrations in Canada geese (*Branta canadensis*) from areas with different levels of fluoride pollution. *Sci. Total Environ.* 1995, 163, 123–128.
12. *Vikoren T., Stuve G.*: Fluoride exposure and selected characteristics of eggs and bones of the Herring gull (*Larus argentatus*) and the Common gull (*Larus canus*). *J. Wildl. Dis.* 1996, 32, 190–198.
13. *Łomnicki A.*: Wprowadzenie do statystyki dla przyrodników. PWN, Warszawa 1995.
14. *Tomiałojć L., Stawarczyk T.*: Awifauna Polski. Rozmieszczenie, liczebność i zmiany. *Pol. Tow. Przyj. Przyr. PTPP. Pro Natura*, Wrocław 2003.
15. *Debackere M., Delbeke F.T.*: Fluoride pollution caused by brickworks in the Flemish countryside of Belgium. *Int. J. Environ. Stud.* 1978, 11, 245–252.
16. *Krook L., Maylin G.A.*: Industrial fluoride pollution. Chronic fluoride poisoning in Cornwall Island cattle. *Cornell Vet.* 1979, 69, Suppl. 8.
17. *Reid R.L., Horvath D.J.*: Soil chemistry and mineral problems in farm livestock, a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 1980, 5, 95–167.
18. *Murray F.*: Fluoride cycles in an estuarine ecosystem. *Sci. Total Environ.* 1981, 17, 223–241.
19. *Wheeler S.M., Fell L.R.*: Fluorides in cattle nutrition. Commonwealth Bureau of Nutrition. *Nutr. Abstr. Rev.* 1983, 53, 12.
20. *Shupe J.L., Olson A.E., Peterson H.B., Low J.B.*: Fluoride toxicosis in wild ungulates. *JAMA*, 1984, 185, 1295–1300.
21. *Baars A.J., van Beek H., Spierenburg T.J., de Graaf G.J., Beefting W.G., Nieuwenhuize J. et al.*: Fluoride pollution in a salt marsh: movement between soil, vegetation, and sheep. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1984, 39, 945–952.
22. *Stewart D.J., Manley T.R., White D.A., Harrison D.L., Stringer E.A.*: Natural fluorine levels in the Bluff area, New Zealand. *N.Z. J. Sci.* 1974, 17, 105–113.
23. *Sturkie P.D.*: Fiziologia ptaków. PWRiL, Warszawa 1970.
24. *Simkiss K.*: Calcium and avian reproduction. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 1975, 35, 307–337.
25. *Chan M.M., Rucker R.B., Zeman F., Riggins R.S.*: Effect of fluoride on bone formation and strength in Japanese quail. *J. Nutr.* 1973, 103, 1431–1440.
26. *Salicki W., Kalisińska E.*: Fluor i wapń w kościach grzywacza (*Columba palumbus*). *Ann. Acad. Med. Stetin.* 2004, 50, Suppl. 1, 94–99.
27. *Machoy Z., Straszko J.*: Próby ustalenia zależności między rozprzestrzenieniem się związków fluoru z emisji przemysłowych a zawartością fluorków w kościach zwierzęcy płowej. *Met. Fluoru*, 1994, 6, 13–15.
28. *Dziedziczko V., Straszko J.*: Kompleksowa ocena jakości powietrza w regionach przemysłowych, znaczenie pomiarów zawartości fluoru w powietrzu. *Met. Fluoru*, 1999, 9, 22–26.
29. *Gutowska I., Dziedziczko V., Machoy-Mokrzyńska A., Zakrzewska H.*: Rola biomonitoringu kumulacji fluoru w kościach zwierząt wolnożyjących w ocenie skażenia środowiska naturalnego. *Met. Fluoru*. 2002, 10, 126–130.
30. *Machoy-Mokrzyńska A., Machoy Z.*: Narastające zagrożenia zwierzęcy płowej przez związki fluoru wzdłuż granicy polsko-niemieckiej Pomorza Zachodniego. *Wszechświat*, 1995, 96, 7–8, 177–178.
31. *Gutowska I., Machoy Z., Machaliński B., Chlubek D.*: Ocena warunków bytowania zwierzęcy płowej z Pomorza Zachodniego i Ziemi Lubuskiej na podstawie zawartości fluorków, wapnia i magnezu w żuchwach. I. Zależności pomiędzy zawartościami pierwiastków w żuchwach zwierząt. *Ann. Acad. Med. Stetin.* 2004, 50, Suppl. 1, 42–46.
32. *Gutowska I., Machoy Z., Chlubek D., Machaliński B.*: Ocena warunków bytowania zwierzęcy płowej z Pomorza Zachodniego i Ziemi Lubuskiej na podstawie zawartości fluorków, wapnia i magnezu w żuchwach. II. Poglębiona analiza statystyczna przy wykorzystaniu programu Statistica Neural Networks. *Ann. Acad. Med. Stetin.* 2004, 50, Suppl. 1, 47–53.
33. *Salicki W., Kalisińska E., Lisowski P.*: Próba wykorzystania grzywacza jako bioindykatora zanieczyszczenia fluorem okolic Szczecina. In: *Obieg pierwiastków w przyrodzie*, t. 2. Eds: B. Gworek, J. Misiak. Instytut Ochrony Środowiska, Warszawa 2003, 400–404.

BARBARA STAWIARSKA-PIĘTA, EWA GRUCKA-MAMCZAR¹, RAFAŁ STOJKO²,
EWA BIRKNER¹, JOLANTA ZALEJSKA-FIOLKA¹

WPLYW FLUORKU SODU I KOFEINY NA STĘŻENIE WAPNIA, FOSFORU I MAGNEZU W SUROWICY KRWI SZCZURÓW

THE EFFECT OF SODIUM FLUORIDE AND CAFFEINE ON CONCENTRATIONS OF CALCIUM, PHOSPHORUS AND MAGNESIUM IN RAT SERUM

Katedra i Zakład Patologii Śląskiej Akademii Medycznej
ul. Ostrogórska 30, 41-200 Sosnowiec

Kierownik: prof. dr hab. n. med. *Ewa Szaflarska-Stojko*

¹ Zakład Biochemii Ogólnej Katedry Biochemii Śląskiej Akademii Medycznej
ul. Jordana 19, 41-808 Zabrze

Kierownik: dr hab. n. med. *Ewa Birkner*

² Katedra i Klinika Położnictwa i Ginekologii Śląskiej Akademii Medycznej
ul. Medyków 14, 40-752 Katowice

Kierownik: dr hab. n. med., prof. *ŚAM Andrzej Witek*

Summary

Purpose: The aim of this study was to examine the effect of sodium fluoride and caffeine on concentrations of calcium, phosphorus, and magnesium in rat serum.

Material and methods: The experiment was carried out in adult male Sprague–Dawley rats. Rats were divided into three groups of six rats. In the control group, animals received distilled water. In study group I, water was supplemented with sodium fluoride (4.9 mg F/kg b.m./24 h), while study group II received sodium fluoride (4.9 mg F/kg b.m./24 h) and caffeine (3 mg/kg b.m./24 h).

Results: Significantly higher calcium concentrations in serum were noted after exposure to NaF and caffeine. There was a tendency to higher levels of calcium in group I. Biochemical analysis of rat serum showed unchanged concentrations of magnesium and phosphorus vs. control. In conclusion, the dose of caffeine used by us had no effect on serum markers of mineral metabolism in hard tissues.

K e y w o r d s: NaF – caffeine – rats – serum – calcium – phosphorus – magnesium.

Streszczenie

Wstęp: Celem pracy było zbadanie wpływu fluorku sodu i kofeiny na stężenie wapnia, fosforu i magnezu w surowicy krwi.

Material i metody: Zwierzęta podzielono na trzy grupy: grupę kontrolną i 2 grupy badane. Grupa badana I otrzymywała fluor w dawce 4,9 mg F/ kg m.c./dobę, grupa badana II taką samą dawkę F⁻ podawaną z 3 mg kofeiny / kg m.c./dobę. Parametry te oznaczano w surowicy krwi szczurów, samców rasy Sprague–Dawley.

Wnioski: Zaobserwowano jedynie znamienne statystyczny wzrost stężenia wapnia w porównaniu z grupą kontrolną w grupie badanej II, po podaniu skojarzonej dawki NaF z kofeiną oraz tendencje wzrostowe w grupie I (F⁻). Nie wykazano zmian w stężeniu magnezu i fosforu w obydwu badanych grupach. Reasumując, kofeina w zastosowanej dawce nie ma znaczącego wpływu na parametry metabolizmu mineralnego związanego z tkankami twardymi w surowicy krwi.

H a s ł a: NaF – kofeina – szczury – surowica – wapń – fosfor – magnez.

Wstęp

Zarówno fluor, jak i kofeina wykazują szerokie spektrum działania na organizmy zwierząt i człowieka. Oddziaływanie związków fluoru i kofeiny na organizmy żywe można rozpatrywać w dwóch aspektach. Pierwszy – związany jest z ich korzystnym działaniem i możliwością wykorzystania w leczeniu niektórych schorzeń, drugi – wiąże się z negatywnym działaniem tych substancji po przekroczeniu dawek dopuszczalnych. Korzystne lub niekorzystne efekty działania tych substancji uzależnione są od dawki, czasu stosowania oraz specyficznego oddziaływania na różne komórki i tkanki.

Fluor, jako pierwiastek śladowy jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania i rozwoju tkanek twardych. Wykazano, że posiada on działanie przeciwpróchnicze i ochronne na szkliwo i zębinę. Działanie to polega na tworzeniu przez fluor z hydroksyapatytami szkliwa związków opornych na działanie kwasów (fluoroapatytów). Związki te charakteryzują się dużą wytrzymałością i mniejszą rozpuszczalnością w wodzie od apatytów wapniowych, co powoduje, że działają ochronnie na zęby. Wykazano, że fluor jest niezbędny do prawidłowej mineralizacji kości i zębów (pobudza on proces tworzenia kości i prowadzi do zwiększenia masy kostnej). Jego odpowiedni poziom zapewnia prawidłowy wzrost kości w okresie dojrzewania. Fluor znalazł także zastosowanie w leczeniu wrodzonej łamliwości kości. Ponadto wykazano, że posiada on właściwości zapobiegające rozwojowi osteoporozy u kobiet [1, 2, 3].

W wielu badaniach epidemiologicznych, eksperymentalnych i klinicznych wykazano wpływ fluoru na stężenie wapnia, fosforanów i magnezu, naturalnych elementów szkieletu i tkanek miękkich, a także na czynniki regulujące wiele funkcji fizjologicznych, np. krzepnięcie krwi, transport tlenu czy aktywację enzymów [4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11]. Jon fluorkowy przenikając z krwi do komórek wchodzi w interakcję z wieloma metalami, które będąc składnikami enzymów odpowiadają za ich sprawne funkcjonowanie. Fluorek łatwo reaguje z jonami magnezowymi, czego konsekwencją jest spadek zawartości tych jonów w komórkach i zaburzenie funkcji enzymów zależnych od magnezu. Przez duże powinowactwo do innych kationów, takich jak Mn^{2+} , Ca^{2+} zaburza podstawowe szlaki metaboliczne komórek, w których te enzymy uczestniczą [12].

Nadmiar fluoru powoduje wiele poważnych zaburzeń w organizmie człowieka. Wykazano jego szkodliwe oddziaływanie na wiele narządów: wątrobę, nerki, serce, centralny układ nerwowy, układ oddechowy, tarczycę, układ sercowo-naczyniowy, układ pokarmowy, jajniki, jądra [1, 2, 3, 5, 11, 13, 14].

Kofeina, podobnie jak tworzące się z niej metabolity, nie należy do związków obojętnych dla organizmu. Jest substancją silnie pobudzającą ośrodkowy układ nerwowy, w wyniku czego usuwa objawy zmęczenia, senności, ułatwia koncentrację uwagi oraz poprawia sprawność myślenia [15, 16].

Kofeina jako alkaloid należący do naturalnych metyloksantyn jest dobrze rozpuszczalna w wodzie. Wchłania się dosyć szybko i całkowicie z przewodu pokarmowego. W poszczególnych tkankach rozmieszcza się proporcjonalnie do ich uwodnienia. Podlega ona prawie całkowitej biotransformacji w wątrobie (98%), gdzie jest metabolizowana przy udziale cytochromu P450 1A (CYP450 1A). Głównym metabolitem u ludzi jest paraksantyna, która następnie ulega przekształceniu do: 1-metyloksantyny, kwasu 1-metylomocznego, 5-acetyloamino-1-metylouracylu oraz 5-acetylo-6-amino-3-metylouracylu. Wszystkie 4 metabolity powstałe z paraksantyny przechodzą do moczu w wyniku aktywnego transportu kanalikowego. Kofeina nie ulega kumulacji [17, 18, 19].

Większość działań farmakologicznych kofeiny jest wynikiem jej hamującego wpływu na fosfodiesterazę. Jest to enzym rozkładający cykliczny AMP (cAMP). W efekcie jej działania następuje nagromadzenie cAMP w komórce, co wzmacnia aktywność kofeiny. Z kolei zwiększone stężenie cAMP w komórce aktywuje procesy metaboliczne. W ostatnich latach wykazano, że zahamowanie tego enzymu występuje przy stężeniach kofeiny 5–10 razy większych od stężeń terapeutycznych [15].

Wykazano, że kofeina w dawkach znacznie mniejszych od dawek hamujących fosfodiesterazę, blokuje receptory adenozynowe A1 i A2 znajdujące się w zakończeniach nerwowych neuronów (presynaptycznie) oraz w mięśniach gładkich naczyń mózgowych (postsynaptycznie). Zablockowanie receptorów postsynaptycznych A1 pobudza procesy przekazywania w ośrodkowym układzie nerwowym. Zablockowanie postsynaptycznych receptorów A2 kurczy mięśnie gładkie naczyń krwionośnych rozszerzonych przez adenozyne [16].

Kofeina spożyta w dawce 1000 mg dziennie wywołuje objawy zatrucia ostrego. U osób nadużywających napojów kofeinowych przez dłuższy czas stosunkowo często rozwija się zatrucie przewlekłe [20]. Kofeina, oprócz wielu działań ubocznych powoduje także wzmożone wypłukiwanie wapnia i magnezu z układu kostnego, co sprzyja rozwojowi osteoporozy. Wykazano, że kofeina wpływa na pracę nerek. Nasila przesączanie kłębuszkowe oraz zwiększa ukrwienie nerek, powodując zwiększenie diurezy. Spożywanie kofeiny w nadmiarze powoduje łagodny wzrost objętości moczu. Pod wpływem kofeiny zwiększa się wydalanie sodu i wapnia z moczem [21, 22].

W wielu pracach przedstawiono toksyczne oddziaływanie kofeiny na płody zwierząt, które często dotyczy wad szkieletu [23, 24]. Z powyższego wynika, że te dwie substancje – fluor i kofeinę łączy niekorzystny wpływ na składniki szkieletu, przy czym fluor wykazuje negatywne działanie zarówno przy niskich, jak i przy wysokich dawkach. Natomiast prawidłowe wartości fluoru są niezbędne w utrzymaniu prawidłowego uzębienia i szkieletu. Kofeina tylko przy przewlekłym narażeniu na duże dawki prowadzi do zaburzeń gospodarki wapniowo-fosforanowej. Fluor stosuje się w leczeniu osteoporozy, podczas gdy kofeina ją nasila.

Zainteresowanie badaczy wzajemnym oddziaływaniem tych substancji związane jest z ze znacznym spożyciem kofeiny i wzrostem narażenia na fluorki obecne w środowisku życia człowieka. Pierwsze obserwacje dotyczące wpływu kofeiny na toksyczność fluoru poczyniono w 70. latach ubiegłego wieku. Zaobserwowano, że kofeina zawarta w kawie może zmniejszać toksyczność fluoru przez tworzenie z nim związków kompleksowych, co hamuje wchłanianie fluoru i zmniejsza objawy zatrucia [25].

Następne obserwacje poczyniono w 1979 roku [26]. Wynika z nich, że do zatrucia fluorem o większym nasileniu dochodziło u osób pijących kawę, niż u tych którzy spożywali inne napoje.

Celem pracy było zbadanie wpływu fluorku sodu oraz kofeiny na stężenie wapnia, fosforu i magnezu w surowicy krwi.

Material i metody

Badania przeprowadzono na osiemnastu szczurach, samcach rasy Sprague–Dowley o początkowej masie ciała 202 +/-2g. Zwierzęta pochodziły z Centralnej Zwierzętarńi Doświadczalnej Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach. Po trzech tygodniach adaptacji (wszystkie były pojone wodą destylowaną) szczury podzielono na trzy grupy liczące po sześć zwierząt. Zwierzęta w grupie kontrolnej (K) otrzymywały wodę destylowaną. Pierwszej grupie szczurów (F⁻) podano fluor w dawce 4,9 mg F/kg m.c./dobę, grupa badana II (F⁻ + kofeina) otrzymała taką samą dawkę F⁻ podawaną z 3 mg kofeiny/kg m.c./dobę. Eksperyment trwał pięćdziesiąt dni. Zwierzęta wszystkich grup były pojone wodą destylowaną *ad libitum* i karmione standardową paszą Altromin (Niemcy), zawierającą 0,7 mg (F⁻). Szczury usypiano dootrzewnowo tiopentalem w dawce 30 mg/szczura. Do badań biochemicznych pobrano od nich krew z serca. W surowicy krwi szczurów oznaczano stężenie wapnia (biochemtest – POCH Gliwice) nr kat. 178280145, stężenie fosforu (biochemtest – POCH Gliwice) nr kat. 17815641 i stężenie magnezu (biochemtest – POCH Gliwice) nr kat. 178220148.

Analiza statystyczna

Wykorzystując program Statistica PL obliczono wskaźniki statystyki opisowej: średnią i odchylenie standardowe. Do porównania różnic między poszczególnymi grupami użyto test U Manna–Whitneya. Za znamienne statystycznie przyjęto zmiany przy poziomie istotności $p < 0,05$.

Wyniki

Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w tabelach 1–3. Zaobserwowano jedynie statystyczny wzrost

stężenia wapnia w porównaniu z grupą kontrolną w grupie badanej II, po podaniu skojarzonej dawki NaF z kofeiną (tab. 1). Wzrosło ono o 36,53% w stosunku do kontroli i o 29,34% w stosunku do grupy badanej I (F⁻).

Tabela 1. Stężenie wapnia w surowicy krwi szczurów

Table 1. Concentrations of calcium in rat serum

Grupa Group	Stężenie Ca (ppm) Ca concentration (ppm)			
	x	± SD	% zmian change (%)	p
Kontrolna / Control	1,67	0,84	–	–
Badana I (F ⁻) Study group I (F ⁻)	1,79	0,93	↑ 7,19	0,575
Badana II (F ⁻ + kofeina) Study group II (F ⁻ + caffeine)	2,28	0,10	↑ 36,53	0,016*

x – średnia arytmetyczna / arithmetic mean; SD – odchylenie standardowe / standard deviation; * różnice istotne na poziomie $p < 0,05$ / statistically significant difference at $p < 0,05$

Tabela 2. Stężenie fosforu w surowicy krwi szczurów

Table 2. Concentrations of phosphorus in rat serum

Grupa Group	Stężenie P (ppm) / P concentration (ppm)			
	x	± SD	% zmian change (%)	p
Kontrolna / Control	1,57	0,45	–	–
Badana I (F ⁻) Study group I (F ⁻)	2,46	2,15	↑ 56,69	0,470
Badana II (F ⁻ + kofeina) Study group II (F ⁻ + caffeine)	1,83	0,24	↑ 16,56	0,150

Tabela 3. Stężenie magnezu w surowicy krwi szczurów

Table 3. Concentrations of magnesium in rat serum

Grupa / Group	Stężenie Mg (ppm) Mg concentration (ppm)			
	x	± SD	% zmian change (%)	p
Kontrolna / Control	0,44	0,09	–	–
Badana I (F ⁻) Study group I (F ⁻)	0,39	0,08	↓ 11,37	0,262
Badana II (F ⁻ + kofeina) Study group II (F ⁻ + caffeine)	0,40	0,07	↓ 9,09	0,261

Nie wykazano zmian w stężeniu magnezu (tab. 2) i fosforu (tab. 3) w obydwu badanych grupach.

Dyskusja

Dotychczasowe badania dowodzą, że nadmierne spożycie kofeiny (pomimo tego, że nie kumuluje się ona w organizmie) wpływa niekorzystnie na organizm, wywołując wiele objawów ubocznych [15, 16, 22, 27]. Badania doświadczalne wykazały również, że kawa lub kofeina podawana wraz z fluorem podwyższa jego stężenie w osoczu, co może prowadzić do powstawania w narządach zmian związanych z jego toksycznością. Kofeina wpływa także na metabolizm oraz modyfikuje działanie fluoru w organizmie [25, 26, 28, 29].

W dotychczas przeprowadzonych badaniach *Grucka-Mamczar i wsp.* [30] wykazali, że podanie szczurom skórzanej dawki fluorku sodu i kofeiny powoduje zaburzenia funkcji wątroby wyrażone spadkiem aktywności enzymów – cholinesterazy (CHE) i dehydrogenazy sorbitolowej (SDH). Odnotowano także tendencje spadkowe enzymów wskaźnikowych aminotransferaz: asparaginianowej i alaninowej (AspAT i AlAT) oraz stężenia cholesterolu i triglicerydów w surowicy krwi. *Birkner i wsp.* [31] na modelu zwierzęcym zbadali wpływ fluoru i kofeiny na funkcję nerek i procesy wolnorodnikowe. Nie zaobserwowali istotnych zmian w oznaczanych markerach (stężeniu mocznika i kreatyniny w surowicy krwi), natomiast zauważono wzrost stężenia białka.

Biorąc pod uwagę istotną rolę wapnia, fosforu i magnezu w organizmie człowieka podjęto się oznaczenia ich stężenia w surowicy krwi szczurów po podaniu im fluorku sodu i kofeiny. Badania te wynikały z dotychczas uzyskanych informacji wskazujących na oddziaływanie zarówno fluorków, jak i kofeiny na tkanki twarde [1, 2, 3, 5, 16, 21, 22, 23, 24]. Miały one wyjaśnić, czy równoczesne obciążanie organizmu zwierząt tymi substancjami będzie w znaczący sposób wpływało na gospodarkę fosforowo-wapniową i poziom magnezu w surowicy krwi.

Uzyskane w przeprowadzonym eksperymencie wyniki świadczą o zaburzeniu gospodarki mineralnej tylko w zakresie stężenia wapnia przy łącznym obciążeniu fluorkiem sodu i kofeiną. Zaobserwowany wzrost białka po podaniu kofeiny i fluoru przez *Grucką-Mamczar i wsp.* [30] koreluje ze wzrostem wapnia obserwowanym w badaniach autorów niniejszej pracy. Jak wiadomo, wysokie stężenie białka jest jedną z przyczyn wzrostu poziomu wapnia w surowicy krwi [32]. Homeostaza wapnia w osoczu jest wynikiem równowagi procesów wchłaniania wapnia w jelicie, obrotu kostnego i jego wydalania przez nerki. Wapń w osoczu występuje w postaci zjonizowanej i w postaci związanej (głównie z albuminami). Jak twierdzą autorzy, wzrost ten może być związany ze zwiększoną diurezą obserwowaną po spożyciu kofeiny. Wydaje się, że statystycznie znamiennej wzrost wapnia po podaniu fluorku sodu z kofeiną w stosunku do grupy kontrolnej może być także związany z uwalnianiem wapnia z kości pod wpływem kofeiny [21, 22].

Większość wapnia i fosforu występuje razem w kościach i w zębach w postaci fosforanów wapnia [1]. Istotnym wa-

runkiem prawidłowej gospodarki fosforanowo-wapniowej jest odpowiedni stosunek wapnia do fosforu w pożywieniu. U osób dorosłych Ca:P powinien wynosić 1:1, jedynie w pożywieniu dzieci iloraz ten powinien mieć wartość 1,3:1 do 6 m.ż. i 1,2:1 w 6–12 m.ż. [32, 33].

Zaburzenia gospodarki wapniowo-fosforanowej po podaniu samego fluorku sodu zaobserwowali liczni badacze [6, 11, 12, 17]. W badaniach na zwierzętach *Grucka-Mamczar i wsp.* [34] wykazali, że istnieje możliwość pojawienia się zaburzeń gospodarki fosforanowo-wapniowej pod wpływem fluorku sodowego obecnego we fluorkowanej wodzie. W późniejszym okresie *Grucka-Mamczar i wsp.* [6] po zatruciu ostrym i przewlekłym fluorkiem sodu zaobserwowali statystycznie znamienne spadki wapnia w surowicy krwi i niezmienną stężenie fosforu i magnezu w porównaniu z grupą kontrolną. Po intoksykacji przewlekłej zaobserwowali zmiany statystycznie znamienne w stężeniu magnezu i wapnia po dawce 100 mg F/dm³, a fosforu po dawce 50 mg F/dm³. Podobne wyniki uzyskał *Tusl i Slesinger* [8]. Po 11 tygodniach zaobserwowali hipokalcemię w surowicy krwi byków. Spadkowi stężenia wapnia towarzyszył wzrost stężenia fosforanów w surowicy krwi. Powyższe obserwacje autorzy tłumaczą wzrostem absorpcji wapnia we włosach i spadkiem wychwytu fosforu przez tkanki u zwierząt.

Takie zmiany w stężeniach tych dwóch parametrów (wzrost fosforu i spadek wapnia) są charakterystyczne dla niewydolności nerek lub uszkodzenia przytarczyc [32]. Biorąc pod uwagę, że największe ilości fluoru kumulują się w nerkach, oraz że fluor wpływa na wszystkie tkanki ustroju (powoduje zmiany wsteczne w nerkach, w gruczołach dokrewnych regulujących poziom wapnia i fosforanów – tarczyca, przytarczyce) [1, 34], należy uwzględnić udział tych narządów w obserwowanych zmianach stężenia badanych parametrów. Również *Appleton* [7] uzyskał podobne wyniki, oznaczając te parametry u szczurów. Natomiast *Bennis i wsp.* [6] zaobserwowali u kóz z fluorozą endemiczną wzrost zawartości fosforanów w surowicy krwi i niezmienną stężenie wapnia. Wzrost fosforanów w surowicy szczurów wykazała także *Grucka-Mamczar i wsp.* [6]. W przeprowadzonych badaniach nie wykazano zmian zawartości fosforu w surowicy krwi zwierząt badanych. Nie zaobserwowano też zmian w stężeniu magnezu zarówno po podaniu fluorku sodu, jak i po łącznym obciążeniu szczurów fluorkiem i kofeiną. Dotychczasowe badania wykazały, że fluorki zmniejszają pulę wolnych jonów magnezowych w płynach ustrojowych i w ten sposób hamują wiele przemian zależnych od magnezu [35].

Zatem uzyskane wyniki wskazują, że podanie tych dwóch substancji jednocześnie jest wypadkową, która nie pokrywa się z działaniem samego fluoru na parametry gospodarki wapniowo-fosforanowej.

Ciekawe wyniki uzyskali *Chan i Whitford* [29], badając wpływ różnych dawek samej kofeiny (3, 25, 100 mg/kg/dobę) przez okres 6 tygodni na równowagę metaboliczną i stężenie fluoru, wapnia i fosforu w tkankach szczurów. Wykazali oni, że podawanie kofeiny nie wpływało na wchłanianie,

wydzielanie z moczem i równowagę fluorkową oraz na jego stężenie w osoczu, w szkliwie i w kości. Podanie kofeiny nie wpłynęło także na metabolizm wapnia i fosforu. Zaobserwowano jedynie wzrost wydalania wapnia z moczem. To działanie nie miało znaczącego wpływu na zachwianie gospodarki wapniowej. Oznaczenia składników mineralnych w kościach były znacząco obniżone tylko w grupie narażonej na najwyższą dawkę kofeiny. Ten wpływ na kości nie naruszał również równowagi wapniowej i fosforanowej. Reasumując, badacze stwierdzili, że podanie kofeiny nie ma znaczącego wpływu na równowagę metaboliczną i stężenie fluoru, wapnia i fosforu w tkankach.

Kofeina może okazać się ważnym czynnikiem wpływającym na gospodarkę wapniową przy narażeniu na fluor. Szczególną ostrożność powinny zachować osoby stosujące fluor w leczeniu osteoporozy, ponieważ efekt leczniczy zależy od poziomu fluoru, a przekroczenie tego stężenia jest uzależnione od ilości spożywanej kofeiny zawartej w kawie [26].

Wnioski

Uzyskane wyniki wskazują na brak znaczącego wpływu jonu fluorkowego podawanego z kofeiną na gospodarkę fosforowo-wapniową i stężenie magnezu w surowicy.

Piśmiennictwo

1. Sikorska-Jaroszyńska M.H.J., Czelej G.: Fluor w stomatologii i medycynie. Wyd. Czelej, Lublin 2000.
2. Pawłowska-Góral K., Wardas W., Wardas M., Kusa Z.: Wpływ związków fluoru na organizm człowieka. Ann. Acad. Med. Siles. 1998, 34–35, 105–115.
3. Pieróg B., Socha M.: Pozytywne i negatywne oddziaływanie fluoru na organizm człowieka. Źródła fluoru w środowisku. Med. Pr. 2000, 1, 75–79.
4. Dąbrowska E., Balunowska M., Letko R.: Zagrożenia wynikające z nadmiernej podaży fluoru. Nowa Stom. 2001, 4, 18, 1–11.
5. Chinoy N.J.: Fluoride in the environment. In: Fluoride in medicine, biology and toxicology. Ed. D. Chlubek. Wyd. Med. Borgis, Warszawa 2003, 5–33.
6. Grucka-Mamczar E., Birkner E., Zalejska-Fiolka J., Birkner B., Kasperczyk A., Kasperczyk S.: Stężenie magnezu, wapnia i fosforu w surowicy krwi szczurów po zatruciu ostrym i przewlekłym fluorkiem sodu. Bromat. Chem. Toksykol. 2004, 37, 1, 53–57.
7. Appleton J.: Changes in the plasma electrolytes and metabolites of the rat following acute exposure to sodium fluoride and strontium chloride. Arch. Oral. Biol. 1995, 40, 4, 265–268.
8. Tusl J., Slesinger L.: Effect of large doses of sodium fluoride and minerals in blood serum, hair and other bovine tissues. Fluoride, 1970, 43, 4, 188–191.
9. Luoma H.: Fluoride and magnesium, two ions in the prevention of calcium salt imbalance, including caries prevention in man and animals. Proc. Finn. Dent. Soc. 1980, 76, 73–77.
10. Grucka-Mamczar E., Machoy Z., Tarnawski R., Birkner E., Polaniak R., Mamczar A.: Wpływ jonu fluorkowego podawanego z wodą pitną na zawartość fluorków magnezu i wapnia w zębach szczurów. Czas. Stomatol. 1998, 51, 7, 427–432.
11. Krechniak J.: Experimental fluorosis. In: Fluoride in medicine, biology and toxicology. Ed. D. Chlubek. Wyd. Med. Borgis, Warszawa 2003, 56–69.
12. Machoy Z.: Biochemiczne mechanizmy działania związków fluoru. Folia Med. Cracov. 1987, 28, 61–81.
13. Ogilvie A.L.: Histological findings in liver, kidney, pancreas, adrenal thyroid gland of rat following sodium fluoride administration. J. Dent. Res. 1953, 32, 386–396.
14. Chongwan Z., Daijei H.: Ultrastructural findings in liver, kidney, thyroid gland and cardiac muscle of rabbits following sodium fluoride administration. Fluoride, 1988, 21, 32–38.
15. Podstawy farmakologii dla lekarzy, farmaceutów i studentów medycyny. Eds: A. Danysz, Z. Kleinrok. Wyd. Volumed, Wrocław 1996, 404–405.
16. Kolanowski W.: Kawa – charakterystyka i znaczenie zdrowotne. Żywność, żywienie a zdrowie, 1998, 3, 305–309.
17. Seńczuk W.: Toksykologia. PZWL, Warszawa, 1994, 241–242, 379–381.
18. Janus K.: Kofeina jako substancja modelowa służąca do oceny metabolicznej wydolności wątroby. Probl. Ter. Monitorowanej, 1993, 4, 1, 27–31.
19. Daniel W.A., Syrek M., Ryłko Z., Wójcikowski J.: Effects of antidepressant drugs on the activity of cytochrome P-450 measured by caffeine oxidation in rat liver microsomes. Pol. J. Pharmacol. 2001, 53, 351–357.
20. Pokorska-Lis G., Woźniak J., Ołędzka R., Kaczkowska K., Szczepanik E.: Wiązanie kofeiny z białkami mleka w obecności azotanów (III) i (V). Bromat. Chem. Toksykol. 2002, 35, 3, 223–230.
21. Curatolo P., Robertson D.: The health consequences of caffeine. Ann. Intern. Med. 1983, 98, 641–653.
22. Harris S.S., Dawson-Hughes B.: Caffeine and bone loss in healthy postmenopausal women. Am. J. Clin. Nutr. 1994, 60, 573–578.
23. Klimmel C.A., Laborde J.B., Trammell C.T.: Evaluation of cartilage and bone formation in fetal skeletons following prenatal insult reveals abnormalities not apparent in alizarin-stained specimens. Teratology, 1982, 25, 54A.
24. Collins T.F.X.: Potential reversibility of skeletal effects in rats exposed in utero caffeine. Fd. Chem. Toxic. 1987, 25, 647–651.
25. Cirkseña W., Mitchell G., Samaras G., Wax C.: Fluoride metabolism. Wien: Verlag Wilhelm Maudrich, 1980, 145–180.
26. Chan J.T., Qui C.C., Whitford G.M., Weatherred J.G.: Influence of coffee on fluoride metabolism in rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1990, 194, 43–47.
27. Burdan F.: Teratogenne i embriotoksyczne działanie kofeiny: fakty i hipotezy. Pol. Mercuriusz Lek. 2000, 9, 52, 726–728.
28. Whitford G.M., Chan J.T.: Lack of significant effect of coffee and caffeine on fluoride metabolism in rats. J. Dent. Res. 1994, 73, 1173–1179.
29. Chan J.T., Whitford G.M.: Effect of caffeine on fluoride, calcium, and phosphorus metabolism and calcified tissues in the rats. Arch. Oral. Biol. 1999, 44, 1, 33–39.
30. Grucka-Mamczar E., Birkner E., Zalejska-Fiolka J., Kasperczyk S., Kasperczyk A., Stawiarska-Pięta B.: Wpływ NaF i kofeiny na aktywność wybranych enzymów i parametrów biochemicznych surowicy krwi szczurów. Ann. Acad. Med. Siles. 2006, 60, 26–30.
31. Birkner E., Grucka-Mamczar E., Żwirska-Korczala K., Zalejska-Fiolka J., Stawiarska-Pięta B., Kasperczyk S.: Influence of sodium fluoride and caffeine on the kidney function and free-radical processes in that organ in adult rats. Biol. Trace Elem. Res. 2006, 109, 35–47.
32. Woschnagg H., Exel W.: Jak interpretować wyniki badań? Wyd. Diogenes, Warszawa 1997, 254–287.
33. Maśliński S., Ryżewski J.: Patofizjologia. PZWL, Warszawa 1992.
34. Shashi A., High J.P., Thapar S.P.: Toxic effect of fluoride on rabbit kidney. Fluoride, 2002, 35, 38–50.
35. Pasternak K., Majdanik M.: Wpływ różnych dawek fluoru na stężenie magnezu i wapnia oraz aktywność aminotransferaz w surowicy krwi i tkankach szczurów. Ann. Univ. Mariae Curie Skłodowska, Lublin 1999/2000, 12/13, 12, 99–105.

ANNA SZYPERSKA, ZYGMUNT MACHOY¹, BOGUSŁAW MACHALIŃSKI

ODDZIAŁYWANIE KOMPLEKSÓW GLINOWO-FLUORKOWYCH (AlF_x) NA ZWIĄZKI WYSOKOENERGETYCZNE (ADP, ATP) OCENIANE PRZY ZASTOSOWANIU MODELOWANIA MOLEKULARNEGO

INTERACTIONS OF ALUMINOFLUORIDE COMPLEXES (AlF_x) WITH HIGH- -ENERGY COMPOUNDS (ADP, ATP) AS REVEALED BY MOLECULAR MODELING

Katedra i Zakład Patologii Ogólnej Pomorskiej Akademii Medycznej
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin

Kierownik: prof. dr hab. n. med. *Bogusław Machaliński*

¹ Katedra Biochemii i Chemii Medycznej Pomorskiej Akademii Medycznej
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin

Kierownik: prof. dr hab. n. med. *Dariusz Chlubek*

Summary

Introduction: Aluminofluoride complexes (AlF_x) are toxic substances at the cellular and subcellular level, apparently implicated in degeneration of the nervous system. The present study focused on direct interactions with AlF_x of two common adenine nucleotides: adenosine diphosphate and adenosine triphosphate, both of which play an important role in many biochemical processes.

The aim was to search for interactions between ADP-AlF_x and ATP-AlF_x complexes depending on the environment of the reaction.

Material and methods: Modern HyperChem computer software was used allowing for the computation of heat of formation and bond energy.

Results: The strongest bonds in vacuum were calculated for ADP-AlF₄¹⁻, ADP-AlF₃ and ATP-AlF₃. In water, the strongest bonds were found for ADP-AlF₃ and ATP-AlF₃. Due to inhibition of metabolic processes, stable bonds between those molecules are less advantageous than labile ones. Nevertheless, strong bonds seem to be associated with reduced toxicity of AlF_x complexes.

K e y w o r d s: Aluminofluoride complexes (AlF_x) – high-energy molecules (ATP, ADP) – AlF_x-ATP, AlF_x-ADP interactions – fluorine and aluminum toxicology – molecular modeling.

Streszczenie

Wstęp: Kompleksy glinowo-fluorkowe (AlF_x) wykazują właściwości toksyczne na poziomie komórkowym i są uważane za jeden z możliwych czynników uszkadzających centralny układ nerwowy. Badania przeprowadzone zostały na dwóch powszechnie występujących w organizmie nukleotydach adeninowych: adenozynodifosforanie (ADP) oraz adenozynotrifosforanie (ATP), odgrywających ważną rolę w przemianach biochemicznych, które poddano bezpośredniemu oddziaływaniu z kompleksami AlF_x.

Celem pracy było stwierdzenie, czy występują wzajemne interakcje między układami: ADP-AlF_x oraz ATP-AlF_x, w zależności od środowiska reakcji.

Material i metody: W badaniach wykorzystano nowoczesne oprogramowanie komputerowe HyperChem, które umożliwia m.in. analizę parametrów energetycznych cząsteczek, takich jak ciepło tworzenia i energia wiązań.

Wyniki: Stwierdzono, że najtrwalsze połączenia w próżni formują się między ADP-AlF₄¹⁻, ADP-AlF₃ i ATP-AlF₃. Natomiast w środowisku wodnym najtrwalsze połączenia występowały między ADP-AlF₃ i ATP-AlF₃. Trwałe połączenia między wymienionymi układami są mniej korzystne niż połączenia labilne, gdyż utrudniają przebieg procesów metabolicznych, a trwałe połączenia z badanymi związkami wysokoenergetycznymi (ATP, ADP) mogą zmniejszać stopień toksyczności kompleksów AlF_x.

H a s ł o: kompleksy glinowo-fluorkowe (AlF_x) – związki wysokoenergetyczne (ATP, ADP) – interakcje AlF_x -ATP, AlF_x -ADP – toksykologia fluoru i glinu – modelowanie molekularne.

Wstęp

Kompleksy fluorku glinu (AlF_x) powstają w sposób spontaniczny w wodnych roztworach, które zawierają fluor i śladowe ilości jonów glinu [1]. Stwierdzono, że fluorki zwiększają jelitową absorpcję glinu, podczas gdy glin zmniejsza wchłanianie fluoru [2]. W przewodzie pokarmowym kompleksy glinowo-fluorkowe podlegają rozpadowi do form polimerycznych [3]. Wzrasta wówczas przyswajalność glinu przez komórki śluzówki przewodu pokarmowego. Istnieją także dowody wskazujące, iż fluorek przyczynia się do uszkodzeń centralnego układu nerwowego m.in. poprzez indukowanie powstawania wolnych rodników i peroksydację lipidów w mózgu (z wyszczególnieniem obszaru hipokampa) oraz zwiększa wchłanianie glinu poprzez barierę krew–mózg [4]. Glin natomiast uznawany jest za czynnik etiopatogenetyczny w chorobie Alzheimera. Przewlekłe narażenie na jednoczesne oddziaływanie glinu oraz fluoru wywołuje zaburzenia behawioralne, zmiany degeneracyjne i upośledzenie metabolizmu tlenowego neuronów [5].

Przypuszcza się, że kompleksy AlF_x działają jako sygnał początkowy stymulujący zaburzenie homeostazy, degenerację i śmierć komórek [6]. Istnieje hipoteza, że kompleksy glinowo-fluorkowe pod względem budowy przestrzennej przypominają analogi fosforanu w nukleotydach adeninowych (ATP, ADP) i guaninowych (GDP, GTP) [1, 7]. *Strunecka* w swoich badaniach wykazała, że kompleksy AlF_x zachowują się jak przekaźniki fałszywych informacji, które są następnie powielane podczas przekształcania ich w odpowiedź komórkową [1, 7]. Analogie pomiędzy grupą fosforanową, występującą w nukleotydach, i kompleksem fluorku glinu opierają się na ich atomowym i molekularnym podobieństwie. Kompleks AlF_x może się zatem wiązać jonowo z cząsteczką ADP lub GDP i w konsekwencji tworzyć kompleksy, które naśladują ATP lub GTP w ich oddziaływaniu na konformację białek. Możliwość powstania kompleksów GDP lub ADP związanych z AlF_x niesie ze sobą niewątpliwie wiele negatywnych zmian i oddziaływań na organizm żywy, m.in. fałszowanie szeregu przemian biochemicznych.

Obecnie znanych jest wiele enzymów wrażliwych na działanie fluorków [8]. Liczną grupę reprezentują enzymy biorące udział w procesie glikolizy oraz utleniania tkankowego jako źródła zaopatrywania w energię erytrocytów [9], m.in. kinaza pirogronianowa (EC.2.7.1.40.) biorąca bezpośredni udział w tworzeniu cząsteczek ATP. *Gumińska* w swoich badaniach in vitro wykazała, że NaF hamuje aktywność kinazy pirogronianowej w hemolizatach erytrocytów ludzkich, prowadząc do zmniejszenia w nich poziomu ATP. Mniejsza ilość wytwarzanego ATP oznacza w ogólności obniżenie podaży energii, co w konsekwencji

prowadzi do osłabienia ogólnej sprawności fizycznej i psychicznej człowieka.

Material i metody

Modelowanie molekularne polega na komputerowym tworzeniu modeli cząsteczek chemicznych, za pomocą których przewidywać można ich rzeczywiste własności fizykochemiczne. Jest to możliwe przy uwzględnieniu podstawowych praw obowiązujących w świecie molekuł [10]. Metody komputerowe w badaniach naukowych i pracach inżynierskich zyskały niekwestionowaną pozycję i wydaje się, że prawdziwy ich rozkwit dopiero nastąpi. Niepodważalną zaletą programów do modelowania molekularnego jest możliwość śledzenia w dowolnym momencie parametrów układu i przeprowadzania eksperymentów niemożliwych do wykonania w praktyce. Symulacje komputerowe przyczyniły się, lub wręcz umożliwiły, rozwiązywanie poważnych problemów stawianych naukom podstawowym [11]. Jednym z pakietów programowych, wykorzystujących nowoczesne metody komputerowe, stosowanych do obliczeń w chemii teoretycznej i eksperymentalnej jest program HyperChem. Pozwala on na obserwację zachowania się danej molekuly przy uwzględnieniu znanych praw fizycznych [12]. Tworzone są specjalne systemy (tzw. algorytmy pól siłowych) opisujące oddziaływanie rozmaitych typów atomów występujących w świecie ożywionym (mechanika molekularna) [13]. Za pomocą ww. programu można określić najtrwalszą strukturę danej cząsteczki (zasada tzw. minimalizacji energii) lub symulować jej drgania w danej temperaturze (dynamika molekularna) [14, 15, 16]. Modelowanie molekularne pozwala przewidywać ułożenie cząsteczek względem siebie w kompleksach, co zostało wykorzystane w badaniach własnych.

Wyniki

W eksperymencie, jako dawcę fluorku, wykorzystano kompleks glinowo-fluorkowy. Może on, w różnych środowiskach, np. w zależności od pH środowiska, uwalniać kolejne jony fluorkowe i częściowo zdysocjowane kompleksy glinowo-fluorkowe, będące także związkami neurotoksycznymi. Dla oceny przebiegu wymienionych interakcji posłużono się metodą modelowania molekularnego w oparciu o oprogramowanie komputerowe HyperChem. Rozpatrywano następujące zdysocjowane formy kompleksu AlF_3 , AlF_2^{1+} , AlF^{2+} , AlF_4^{1-} .

Początkowym etapem badań było przeprowadzenie wizualizacji danych molekuł (cząsteczek ADP i ATP poddanych reakcjom z AlF_x) w próżni oraz w środowisku wodnym, a następnie, po zoptymalizowaniu geometrycznym i uzyskaniu minimum globalnego energii cząsteczki, oceniono następujące fizyczne parametry: ciepło tworzenia (kcal/mol), energię całkowitą (a.u.), energię wiązania (kcal/mol) i moment dipolowy (D).

Po przeanalizowaniu stechiometrii poszczególnych molekuł wykluczono połączenia ATP- AlF_4^{1-} przy pierwszym i drugim wiązaniu fosforanowym oraz w kompleksach ATP- AlF_2^{1+} przy drugim wiązaniu fosforanowym (w próżni oraz w środowisku wodnym), ze względu na tworzenie się bardzo długich wiązań (rzędu 10 Å). Tak długie wiązania wskazują na niemożność formowania się ww. połączeń. Kolejnymi etapami analizy modelowanych molekuł były:

1. Zestawienie obliczonych parametrów energetycznych w postaci tabelarycznej (tab. 1, 2, 3, 4).

2. Analiza diagramów energetycznych badanych molekuł. Przykładem, który obrazuje wpływ kompleksów AlF_x na poziomy energetyczne cząsteczek może być połączenie ADP i ADP-AlF_3 w próżni (ryc. 1).

3. Ważnym elementem badań za pomocą programu HyperChem była wizualizacja orbitali granicznych cząsteczek. Pozwala to na wskazanie, które orbitale biorą bezpośredni udział w tworzeniu wiązań chemicznych.

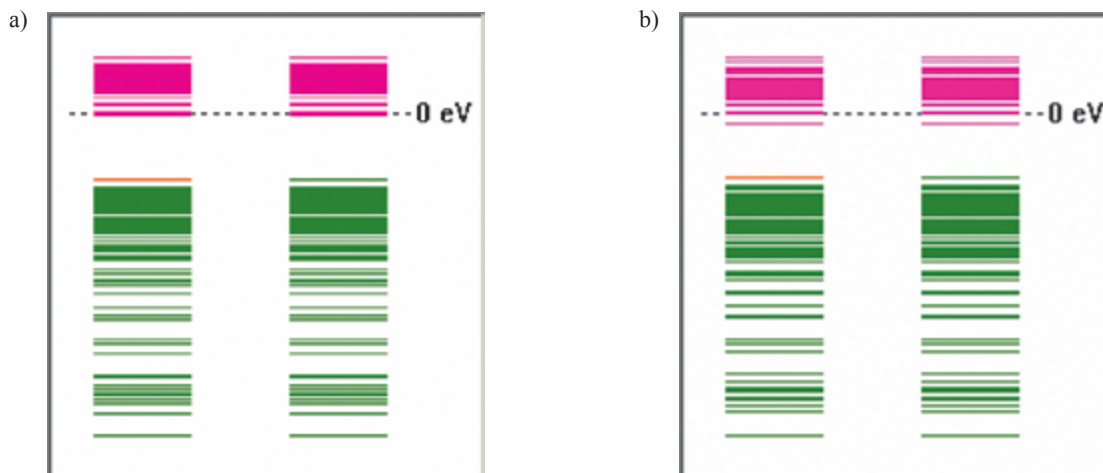
4. Przedstawienie rozkładu potencjałów elektrostatycznych, co pozwala przewidzieć gdzie nastąpi przyłączenie podstawnika nukleofilowego lub elektrofilowego. Za przykład może posłużyć cząsteczka ADP oraz połączenie ADP-AlF_3 (ryc. 2).

Dyskusja

Od kilkunastu lat zainteresowanie budzą kompleksy AlF_x , gdyż mogą się one zachowywać jak przekaźniki fałszywych informacji, które są następnie powielane podczas przekształcania ich w odpowiedź komórkową [1]. Dlatego podjęto badania umożliwiające ocenę zachowania się kompleksów glinowo-fluorkowych w różnych środowiskach reakcji i ocenę ich oddziaływania ze związkami wysokoenergetycznymi [17]. W pracy, jako dawca atomu fluoru, posłużył kompleks glinowo-fluorkowy, mający pośredni wpływ na metabolizm i morfologię różnych organów wewnętrznych człowieka, między innymi na zmiany metabolizmu energetycznego. Wcześniejsze doniesienia sugerują

[6], że równoczesna obecność glinu i fluoru w wodzie pitnej wzmacnia ich działanie toksyczne.

Modelowanie molekularne pozwala wirtualnie śledzić każdy etap reagujących ze sobą cząsteczek. Wcześniejsze badania dowiodły, że fluor łącząc się z glinem w specyficzne kompleksy zmienia wiele ich parametrów energetycznych [18]. W materiale własnym były to: ciepło tworzenia, energia całkowita i energia wiązań. Stwierdzono, że powstawanie wiązania: związek wysokoenergetyczny (ADP, ATP)-kompleks glinowo-fluorkowy, może mieć wpływ na jego funkcje. Geometria układu: związek wysokoenergetyczny- AlF_x zależy od rodzaju podstawnika (w materiale własnym był to kompleks AlF_x). Omawiany kompleks ma wpływ na położenie pierścienia guaniny, adeniny oraz rybozy w nukleotydach adeninowych (ATP, ADP) w układzie współrzędnych OXY, jak też na zmianę położenia atomów zaangażowanych w tworzenie wiązań z innymi biologicznie czynnymi molekułami. Jak wiadomo budowa przestrzenna molekuł warunkuje ich właściwości fizykochemiczne. Analiza rozkładu potencjału elektrostatycznego wskazała obszary największego skupienia ładunków ujemnych i dodatnich dla układów ADP-AlF_x i ATP-AlF_x , co pozwala przewidzieć, gdzie może nastąpić atak nukleofilowy bądź elektrofilowy (ryc. 2). Były to: atomy tlenu i azotu w pierścieniu adeniny i guaniny; atomy fluoru pochodzące z kompleksów AlF_x ; atom tlenu w reszcie fosforanowej (ryc. 2). Ponadto odnotowano, że kompleksy AlF_x mają wpływ na tworzenie wiązań z innymi molekułami wysokoenergetycznymi. U podstaw tych możliwych interakcji leżą ich fizykochemiczne właściwości (ciepło tworzenia, energia całkowita, energia wiązań), które decydują o trwałości danych połączeń międzycząsteczkowych. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że najbardziej trwałymi połączeniami w próżni są: ADP-AlF_4^{1-} , ADP-AlF_3 , ATP-AlF_3 , natomiast w środowisku wodnym były: ADP-AlF_3 i ATP-AlF_3 (tab. 1, 2). Najslabszymi okazały się połączenia pomiędzy ADP i ATP z AlF_2^{2+} , zarówno w próżni jak i w środowisku wodnym (tab. 3, 4). Nietrwałe formowanie się kompleksu AlF_2^{2+} z nukleotydami (ADP, ATP) z punktu widzenia przemian biochemicznych jest zjawiskiem korzyst-



Ryc. 1. Diagramy energetyczne cząsteczek: a) ADP; b) ADP-AlF_3

Fig. 1. Energy diagrams for: a) ADP; b) ADP-AlF_3

Tabela 1. Zestawienie wartości ciepła tworzenia (kcal/mol) cząsteczki ADP z kompleksami AlF_x Table 1. Heat of formation (kcal/mol) for AlF_x -ADP complexes

Usytuowanie AlF_x Position of AlF_x	ADP- AlF_3	ADP- AlF_2^{1+}	ADP- AlF^{2+}	ADP- AlF_4^{1-}	Środowisko Environment
I tlen Oxygen № 1	-843	-738	-634	-860	próżnia vacuum
I tlen Oxygen № 1	-837	-717	-602	-688	woda water
II tlen Oxygen № 2	-823	-735	-643	-854	próżnia vacuum
II tlen Oxygen № 2	-821	–	-632	–	woda water

Tabela 2. Zestawienie wartości ciepła tworzenia (kcal/mol) cząsteczki ATP z kompleksami AlF_x Table 2. Heat of formation (kcal/mol) for AlF_x -ATP complexes

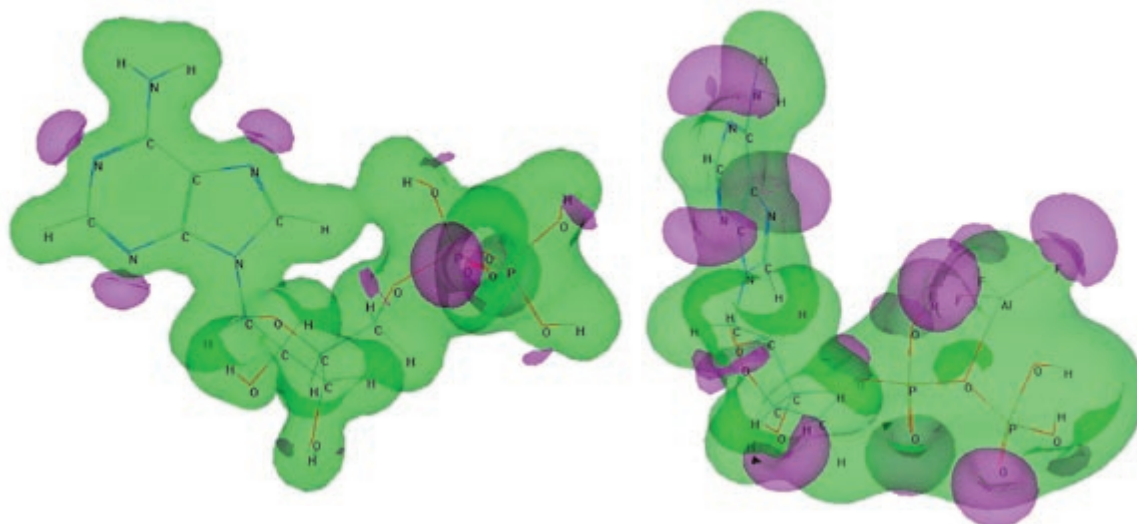
Usytuowanie AlF_x Position of AlF_x	ATP- AlF_3	ATP- AlF_2^{1+}	ATP- AlF^{2+}	ATP- AlF_4^{1-}	Środowisko Environment
I tlen Oxygen № 1	-1055	-965	-861	–	próżnia vacuum
I tlen Oxygen № 1	-1050	-947	-835	–	woda water
II tlen Oxygen № 2	-1046	–	-843	–	próżnia vacuum
II tlen Oxygen № 2	-1043	–	-849	–	woda water
III tlen Oxygen № 3	-1057	-960	-860	-1069	próżnia vacuum
III tlen Oxygen № 3	–	-958	–	-1060	woda water

Tabela 3. Zestawienie wartości energii całkowitych (kcal/mol) cząsteczki ADP z kompleksami AlF_x Table 3. Total energy (kcal/mol) for AlF_x -ADP complexes

Usytuowanie AlF_x Position of AlF_x	ADP- AlF_3	ADP- AlF_2^{1+}	ADP- AlF^{2+}	ADP- AlF_4^{1-}	Środowisko Environment
I tlen Oxygen № 1	-156643	-146429	-136218	-166768	próżnia vacuum
I tlen Oxygen № 1	-156637	-146409	-136185	-166596	woda water
II tlen Oxygen № 2	-156623	-146426	-136226	-166761	próżnia vacuum
II tlen Oxygen № 2	-156622	–	-136215	–	woda water

Tabela 4. Zestawienie wartości energii całkowitych (kcal/mol) cząsteczki ATP z kompleksami AlF_x Table 4. Total energy (kcal/mol) for AlF_x -ATP complexes

Usytuowanie AlF_x Position of AlF_x	ATP- AlF_3	ATP- AlF_2^{1+}	ATP- AlF^{2+}	ATP- AlF_4^{1-}	Środowisko Environment
I tlen Oxygen № 1	-180200	-170002	-159789	–	próżnia vacuum
I tlen Oxygen № 1	-180195	-169984	-159764	–	woda water
II tlen Oxygen № 2	-180192	–	-159771	–	próżnia vacuum
II tlen Oxygen № 2	-180188	–	-159777	–	woda water
III tlen Oxygen № 3	-180202	-169997	-159789	-190323	próżnia vacuum
III tlen Oxygen № 3	–	-169995	–	-190314	woda water



Kolor fioletowy określa obszar kumulacji ładunków ujemnych, a zielony – ładunków dodatnich / Sites of accumulation of negative and positive charges are shown in violet and green, respectively

Ryc. 2. Rozkład potencjału elektrostatycznego cząsteczek: a) ADP; b) ADP-AlF₃
Fig. 2. Distribution of electrostatic potential in: a) ADP; b) ADP-AlF₃

nym, gdyż połączenia o niskiej wartości energii całkowitej są łatwiejsze do rozerwania, czyli są mniej trwałe. Taki układ (AlF₂⁺-ADP, ATP) będzie niestabilny i w mniejszym stopniu może hamować wytwarzanie ATP. Połączenie ADP z AlF₃ stanowi największe zagrożenie dla gospodarki energetycznej komórki ze względu na możliwość długotrwałego hamowania syntezy ATP, jak również imitowania przez związany kompleks AlF₃ grupy fosforanowej, co skutkować może przekazem fałszywych informacji i odpowiedzi komórkowych, między innymi przez zaburzanie funkcji przekaźników nerwowych.

Wnioski

Za pomocą programu komputerowego HyperChem wykazano, że formują się nierównocenne międzycząsteczkowe połączenia związków wysokoenergetycznych z kompleksami glinowo-fluorkowymi, które zależą także od środowiska reakcji (próżnia i środowisko wodne). Modelowanie molekularne pozwoliło wykazać różną trwałość połączeń kompleksów AlF_x ze związkami wysokoenergetycznymi, biorących udział w wytwarzaniu energii w organizmach żywych. Przeprowadzone symulacje i obliczenia komputerowe stanowią wkład w lepsze zrozumienie mechanizmu przekazywania fałszywych informacji na poziomie molekularnym przesyłanych do komórki poprzez centralny układ nerwowy.

Piśmiennictwo

1. *Strunecka A., Strunecky O., Patočka J.*: Fluoride plus aluminium. Useful tools in laboratory investigations, but messengers of false information, 2002, *Physiol. Res.* 51, 557–564.
2. *Lubkowska A., Żyłuk B., Chlubek D.*: Interakcje fluoru z glinem. Research Review. *Fluoride*, 2002, 35 (2), 73–77.
3. *Strunecka A., Patočka J.*: Pharmacological and toxicological effects of aluminofluoride complexes. *Fluoride*, 1999, 32(4), 230–242.
4. *Blaylock R.L.*: Excitotoxicity: a possible central mechanism in fluoride neurotoxicity, *Fluoride*, 2004, 37 (4), 301–314.
5. *Lubkowska A.*: Interakcje pomiędzy fluorem i glinem w organizmie szczura ze szczególnym uwzględnieniem struktur ośrodkowego układu nerwowego. [Maszynopis powielany] Pom. Akad. Med. Szczecin 2005.
6. *Campbell A.*: The potential role of aluminium in Alzheimer's disease. *Nephrol. Dial. Transplant*, 2002, 17 Suppl. 2, 17–20.
7. *Strunecka A.*: Fluoride and aluminium, XXV ISFR Conference, 21–25 Jan, Dunedin, New Zealand 2003, 15–18.
8. *Chlubek D., Machoy Z.*: Znaczenie wpływu wielkości dawki fluorku na aktywność enzymów w badaniach in vivo i in vitro. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1989, 22 (3–4), 235–245.
9. *Gumińska M.*: Wpływ fluorków na gospodarkę energetyczną in vitro i in vivo oraz związane z tym efekty biologiczne. VI Sympozjum Fluorowe, Polskie Towarzystwo Biochemiczne, 25 września 1994, Szczecin.
10. *Forster M.J.*: Molecular modeling in structural biology, *Micron*, 2002, 33, 365–384.
11. *Hinchliffe A.*: Modeling molecular structures, *Biochem. Educ.* 1998, 26, 35–39.
12. *Karplus M., Petesko G.A.*: Molecular Dynamics Simulations in Biology, *Nature*, 1990, 347, 631–639.
13. *Straszko J., Paprota S.*: Modelowanie molekularne. *Chemia kwantowa, Instytut Inżynierii Chemicznej i Chemii Fizycznej. Wyd. Uczel. Polit. Szczec. Szczecin 1998, 62–68.*
14. *HyperChem: Computational Chemistry, Molecular Visualization and Simulation, Hypercube, Inc., 1994, Publication HC 40-00-03-00.*
15. *Sansom C.E., Smith A.C.*: Computer applications in the biomolecular sciences, Part 1: molecular modeling. *Biochem. Educ.* 1998, 26, 103–110.
16. *Szyperska A.*: Modelowanie molekularne wybranych związków biologicznie aktywnych w interakcji z kompleksami glinowo-fluorkowymi. [Maszynopis powielany] Polit. Szczec. Szczecin 2004.
17. *Gutowska I., Szyperska A., Machoy Z., Machaliński B., Chlubek D.*: Interactions between AlF_x and GDP in various media presented on the basis of molecular modelling. XXVI Conference ISFR Wiesbaden, 26–29 September 2005.
18. *Machoy Z., Gutowska I., Straszko J., Machaliński B.*: Comparative research concerning behavior of GDP and AlF₃ in vacuum and in water environments using molecular modelling. Abstracts of the 39th meeting of the Polish Biochemical Society. Gdańsk, 16–20 Sept. 2003, 190. In: *Acta Bioch. Pol.* 2003, 50 (1), 190.

HELENA ZAKRZEWSKA, JAN UDAŁA¹

WPLYW FLUORKU SODU NA ZAWARTOŚĆ ATP W NASIENIU TRYKA W BADANIACH IN VITRO

IN VITRO INFLUENCE OF SODIUM FLUORIDE ON ADENOSINE TRIPHOSPHATE (ATP) CONTENT IN RAM SEMEN

Katedra Biochemii Akademii Rolniczej w Szczecinie
ul. Słowackiego 17, 71-434 Szczecin
Kierownik: prof. dr hab. *Janina Krystyna Nowak*
¹ Katedra Rozrodu Akademii Rolniczej w Szczecinie
ul. Doktora Judyma 6, 70-460 Szczecin
Kierownik: prof. dr hab. *Jan Mieczysław Udała*

Summary

Introduction: The motility of spermatozoa results from formation of chemical energy and its transformation into mechanical energy. The quality of spermatozoa is determined primarily by their ability to move. Spermatozoa viability depends on two factors: generation of an adequate supply of ATP and effective use of ATP stores. Biochemical methods are useful for an objective assessment of semen quality. Among them is the measurement of ATP content.

The aim of this work was to determine the effect of sodium fluoride at concentrations of 20, 100, 200, and 10⁵ µmol/L on ATP content in ram semen.

Material and methods: Altogether, 19 ejaculates into an artificial vagina were collected from rams kept at the University of Agriculture and at the Glinna farm. Parameters of the semen were within limits acceptable for this animal species. The content of ATP was measured with a bioluminometric method and Lumat LB 9807 Berthold luminometer.

Results: The semen was diluted in 0.9% NaCl and was found to contain 12.4 µmol ATP·10⁻⁹ spermatozoa. ATP content was reduced with rising concentrations of NaF: by 74.6% at 20 µmol/L; by 75.5% at 100 µmol/L; by 90.8% at 200 µmol/L; and by 99.9% at 10⁵ µmol/L. The correlation between ATP content and sperm motility was significant ($r = 0.4990$). There was no correlation between ATP content and sperm density.

K e y w o r d s: fluoride – ATP – ram – semen.

Streszczenie

Wstęp: Ruch plemników jest efektem tworzenia energii chemicznej i przekształcania jej w energię mechaniczną. Ruchliwość plemników jest jednym z ważniejszych parametrów w ocenie ich wartości. Żywotność plemników zależy od dwóch czynników: 1) zdolności do generowania dostatecznej ilości ATP oraz 2) do zdolności efektywnego jej wykorzystania. Biochemiczne metody mogą dostarczyć obiektywnych parametrów oceny jakości nasienia. Jedną z nich jest ocena zawartości ATP.

Celem badań była ocena wpływu fluorku sodu o stężeniu 20, 100, 200, 10⁵ µmol/L, na zawartość ATP w nasieniu tryka.

Materiał i metody: Pobrano 19 ejakulatów na sztuczną pochwę od tryków utrzymywanych w zwierzętarni Akademii Rolniczej w Szczecinie i w ZZD Kołbacz – farma Glinna. Nasienie do badań odpowiadało parametrom przyjętym dla tego gatunku zwierząt. Zawartość ATP oznaczono metodą bioluminometryczną przy użyciu systemu Lumat LB 9807 Berthold luminometr.

Wyniki: Nasienie po rozrzedzeniu 0,9% NaCl zawierało 12,4 µmol ATP·10⁻⁹ plemników. Zawartość ATP w zleżności od zastosowanego stężenia fluorku sodu, zmniejszała się: przy 20 µmol/L o 74,6%, przy 100 µmol/L o 75,5%, przy 200 µmol/L o 90,8%, a przy 10⁵ µmol/L o 99,9%. Wyliczona korelacja pomiędzy zawartością ATP i ruchliwością była istotna i wynosiła $r = 0,4990$. Nie zaobserwowano

istotnej korelacji pomiędzy zawartością ATP i gęstością nasienia.

H a s ł a: fluorki – ATP – tryk – nasienie.

Wstęp

Istnieje ścisły związek pomiędzy ruchliwością plemnika a cAMP. Związek ten poprzedza sekwencja następujących po sobie zdarzeń: synteza cAMP z ATP katalizowana przez cyklazę adenylanową, fosforylacja przez ATP specyficznych endogennych białek aksonemy, transfosforylacja pomiędzy wolnym ATP a tubuliną związaną z GDP i defosforylacja ATP do ADP, katalizowana przez ATPazę dyneiny [1]. Ruch plemnika jest efektem tworzenia energii chemicznej (ATP) i jej przekształcenia w energię mechaniczną.

Wiele ośrodków naukowych na świecie w celu opracowania nowych obiektywnych kryteriów oceny nasienia zastosowało oznaczanie zawartości ATP [2] oraz inne metody biochemiczne, jak aktywność wybranych enzymów nasienia [3]. Ruchliwość plemników jest jednym z ważniejszych parametrów w ocenie ich wartości, dlatego w piśmiennictwie można spotkać wiele sprzecznych wyników dotyczących korelacji pomiędzy zawartością ATP i ruchliwością oraz pomiędzy zawartością ATP i gęstością nasienia [4, 5, 6].

Material i metody

Nasienie pobrano od 19 tryków pochodzących ze zwierzątarni Akademii Rolniczej Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt w Szczecinie oraz z ZZD Kołbacz, z farmy Glinna.

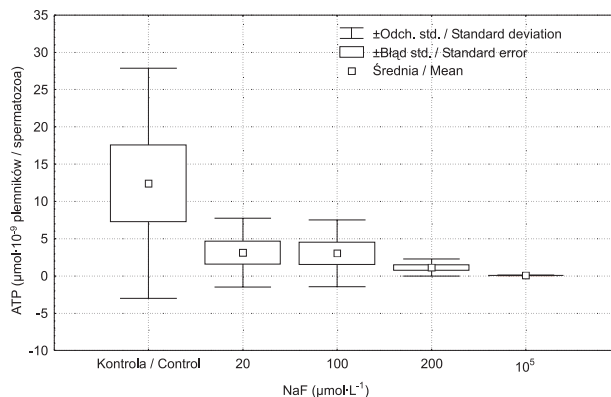
Nasienie po pobraniu poddawano ocenie jakościowej, po czym rozrzedzano je roztworem fizjologicznym 0,9% roztworem NaCl w stosunku 1:5, po czym dzielono je na 5 części, do których dodawano roztwór zawierający fluorek sodu o odpowiednich stężeniach 20, 100, 200 oraz $10^5 \mu\text{mol/L}$ w stosunku 1:1. Próbę kontrolną stanowiło nasienie rozrzedzone samym roztworem 0,9% NaCl. Zawartość ATP oznaczono według metody 1 podanej przez *Gotlieba i wsp.* [7].

Wyniki

Wyniki badań przedstawiono na rycinach 1–3. We wszystkich próbkach oznaczono zawartość ATP w $\mu\text{mol ATP} \cdot 10^{-9}$ plemników.

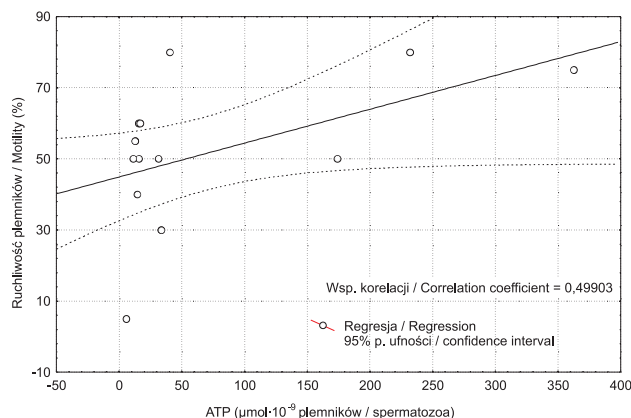
We wszystkich zastosowanych stężeniach fluorku sodu w badaniach in vitro zaobserwowano zmniejszenie zawartości ATP w nasieniu tryków (ryc. 1).

Stwierdzono istotną statystycznie przy $p \leq 0,05$ dodatnią korelację pomiędzy zawartością ATP w nasieniu i ruchliwością plemników tryka (ryc. 2) oraz brak korelacji pomiędzy gęstością nasienia tryka i zawartością ATP (ryc. 3).



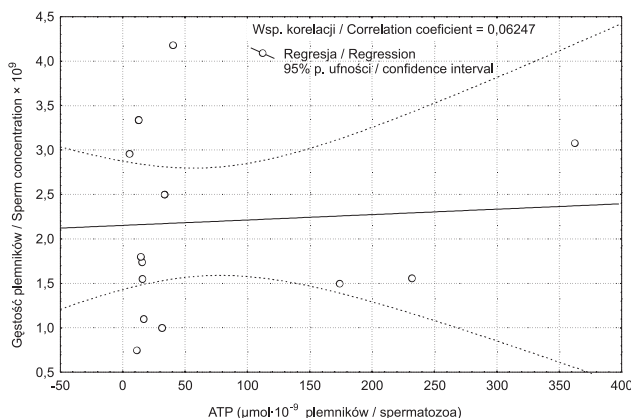
Ryc. 1. Wpływ fluorku sodu na zawartość ATP w nasieniu tryka w badaniach in vitro

Fig. 1. In vitro influence of NaF on ATP content in ram semen



Ryc. 2. Korelacja pomiędzy zawartością ATP w nasieniu i ruchliwością plemników tryka

Fig. 2. Correlation between ATP content in ram semen and spermatozoa motility



Ryc. 3. Korelacja pomiędzy gęstością nasienia tryka i zawartością ATP

Fig. 3. Correlation between sperm density and ATP content in ram semen

Dyskusja

Fizjologiczne stężenie nukleotydów adeninowych w nasieniu wykazuje dużą zmienność gatunkową [4, 8, 9]. Wyniki badań są często nieporównywalne ze względu na stosowanie różnych jednostek, na przykład u bydła

$18,7 \pm 5,6$ nmol/plemników $\times 10$; $1,7 \pm 0,4$ $\mu\text{g/mL}$ [8, 9], u ludzi $36,0$ nmol/mL [4]. Zdania na temat istnienia statystycznie istotnej korelacji pomiędzy zawartością ATP i zdolnością do zapłodnienia są podzielone. *Soderquist* i *Stalhammar* [10] wykazali istotną statystycznie korelację pomiędzy zawartością ATP a ruchliwością plemników u bydła zarówno w nasieniu świeżym, jak i po rozmrożeniu [10]. Współczynnik korelacji był zbliżony do współczynnika uzyskanego w badaniach własnych i wynosił $0,55$. Odmienne zdanie mają *Levin* i *wsp.* oraz *Chan* i *Wang* [5, 11]. Nie ma zgodności co do istnienia korelacji pomiędzy zawartością ATP i gęstością nasienia [4, 5, 6]. Różnice mogą wynikać z różnych ilości branych do wyliczeń plemników żywych lub martwych. W piśmiennictwie brakuje informacji na temat wpływu fluoru na metabolizm energetyczny plemnika. Zaobserwowano natomiast spadek zawartości ATP w erytrocytach oraz we krwi jagniąt eksponowanych na fluor przez 12 miesięcy [12].

Wnioski

1. Fluorek sodu o stężeniu 20, 100, 200 i 10^5 $\mu\text{mol/L}$ obniża istotnie zawartość ATP w nasieniu tryka, co może prowadzić do niekorzystnych zmian w metabolizmie energetycznym plemnika.

2. Niewielkie stężenia fluorku (rzędu mikromoli) wpływają upośledzająco na funkcje plemnika, wyrażające się zmniejszeniem jego ruchliwości.

Piśmiennictwo

1. *Mann T., Lutwak-Mann C.*: Male reproductive function and semen. Springer Verlag, New York, 1988, 195–268.
2. *Hofmann R., Lehmer A., Gurster E., Hartung R.*: Adenosine Triphosphate and Adenosine Diphosphate in human semen: Correlation with sperm count and motility. *Urol. Int.* 1992, 48, 391–394.
3. *Upreti G., Payne S., Duganzich D., Oliver J., Smith J.*: Enzyme leakage during cryopreservation of ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 1996, 41, 27–36.
4. *Gottlieb C., Svanborg K., Bygdeman M.*: Adenosine triphosphate (ATP) in human spermatozoa *Andrologia*, 1991, 23, 421–425.
5. *Levin R., Shofer J., Wein A., Greenberg S.*: ATP concentration of human spermatozoa: Lack of correlation with sperm motility. *Andrologia*, 1981, 13, 468–472.
6. *Orlando C., Caldini A., Fiorelli G., Cuomo S., Seriou M.*: ATP and ADP content of human ejaculated spermatozoa. *J. Androl.* 1982, 5, 497–502.
7. *Gottlieb C., Svanborg K., Eneroth P., Bygdeman M.*: Adenosine triphosphate in human semen: a study on conditions for a bioluminescence assay. *Fertil. Steril.* 1987, 47 (6), 992–999.
8. *Soderquist L., Rodriguez-Martinez H., Janson L.*: Post-thaw motility, ATP and cytochrome C oxidase activity of A.I. bull spermatozoa in relation fertility. *J. Vet. Med.* 1991, A 38, 165–174.
9. *Rodriquez-Martinez H.*: Assesment of sperm viability by measurement of ATP, membrane integrity and motility in frozen/thawed bull semen. *Acta Vet. Scand.* 1995, 36, 571–574.
10. *Soderquist L., Stalhammar E.*: Relationship between ATP content and motility in bovine spermatozoa with reference to the effect of the bull and the A.I. center. *Acta Vet. Scand.* 1991, 32, 353–359.
11. *Chan S., Wang C.*: Correlation between semen adenosine triphosphate, and sperm fertilizing capacity. *Fertil. Steril.* 1987, 4, 717–719.
12. *Suska M.*: Energy metabolism of erythrocytes in lambs chronically exposed to fluorine compounds. *Acta Vet. Brno* 2002, 71, 313–317.

Annales Academiae Medicae Stetinensis – Annals of the Pomeranian Medical University is a scientific periodical regularly published since 1951. *Annals* content is covered by all major abstracting and indexing services, including Index Medicus (Medline), Biological Abstracts, and Chemical Abstracts, and is accessible in more than 150 national and foreign libraries.

Annals accepts original articles, reviews, and case reports relevant to basic sciences, clinical research, and medical humanities, by authors at the Pomeranian Medical University, as well as at other national and foreign centres.

Papers in Polish or English should be submitted in line with the Notice to Contributors. Each volume consists of three parts: (1) original articles, concise doctoral theses, reviews, etc.; (2) chronicle of the Pomeranian Medical University for the past year with the inaugural address by the Rector opening the current academic year; and (3) list of departments and annual bibliography of the University.

As of volume 50, changes have been introduced into the Notice to Contributors.

NOTICE TO CONTRIBUTORS*

Annales Academiae Medicae Stetinensis – Annals of the Pomeranian Medical University

Annales Academiae Medicae Stetinensis – Annals of the Pomeranian Medical University accepts original articles in all fields of medicine, including those being too extensive to be published in specialized periodicals.

The typescript should not exceed 20–25 pages of A4 size paper, inclusive of figures, tables, legends, references cited (limited to a minimum), and abstracts.

The article in Polish or English is to be typed on white paper, without highlighting. Only one side of the sheet is to be typed on, the other side is to remain empty. A 12-point font and double spacing are to be used throughout. Pages should be numbered consecutively starting with the title page and placing the number in the bottom right corner of every page. The text should be structured as follows: title page, main text, illustrative material, references.

Title page

The following information should be given: names and surnames of author (authors); title in two languages; institution conferring the scientific degree (in case of a doctoral dissertation) or employing the author (name and address, head's scientific title and degree); key words in two languages, listed in the MeSH catalogue; address and name of institution where the work was performed; details of the dissertation (applicable to doctoral theses: name of promotor, number in the original thesis of: pages, figures, tables, and references).

Main text

S u m m a r y: in English and/or other language, structured as follows: objectives of study or trial, basic procedures (enrolment criteria, methods of observation or analysis), basic results (important data and their statistical significance), and conclusions. New and important aspects of the study should be exposed. **I n t r o d u c t i o n:** presentation of the objectives of the study and reasons for undertaking the investigation, accompanied by references if needed. **M e t h o d s:** easy to understand description of criteria for selection of study material and of research and statistical methods applied. **R e s u l t s:** in logical order, not repeating data given in tables and figures, with emphasis on important findings. **D i s c u s s i o n:** focusing on new and important aspects of the study and on conclusions arising therefrom, without repeating information from the Introduction and Results sections. Comparisons with the findings of other authors should be made. **C o n c l u s i o n s:** related to the study objectives and concisely presented. **S t r u c t u r e d a b s t r a c t** (Introduction, Material and Methods, Results, Conclusions): in the language of the article, presenting the quintessence of the study and counting from 200 to 250 words. **A b b r e v i a t i o n s:** used for the first time should be preceded by the term in full. A sentence should not begin with an abbreviation. **U n i t s o f m e a s u r e m e n t a n d t h e i r s y m b o l s** should belong to the international SI system. **K e y w o r d s:** 3 to 6 words, not repeating words in the title of the article, listed in the MeSH catalogue.

Illustrative material

Each figure (graph, diagram and photograph) and table should be accompanied by a title (under the figure, above the table). Figures and tables should be provided each on a separate page, oriented (top – bottom), and numbered consecutively as cited in the text. Figures and tables should be numbered separately. Micrographs should possess a scale bar and the symbols, arrows and signs should be legible. Colours should be used only in case of necessity. Titles and internal information of the figures and tables should be in Polish and English. Numbers should be shown on the typescript margin at places where the figure or table is to appear.

References

References cited should be numbered in the order as they appear in the text. Each reference should be typed starting from a new line. References should not be duplicated. Numbers of the references should be given in brackets, separated by commas and spaces. Surname of every author with initial letters of names are to be given. All authors should be shown when the article has no more than six authors; if otherwise, the first six authors should be given, followed by *et al.* The name of the journal should be abbreviated using Index Medicus (Medline) format.

Typescripts should be submitted in duplicate and accompanied by an electronic version (diskette or CD-ROM) in MS Word format.

* Based on the guidelines published by the International Committee of Medical Journal Editors cf. *Problemy Medycyny Nuklearnej* 1997, 11 (21), 67–87.

NADCHODZĄCE WYDARZENIA NAUKOWE W PAM

- **ZAKAŻENIE A ZDROWIE REPRODUKCYJNE KOBIET** – styczeń 2007 r., Kazimierz nad Wisłą. Organizatorzy: Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii PAM.
- **PROBLEMY NEUROLOGICZNE OKRESU NOWORODKOWEGO, WCZESNA REHABILITACJA** – 1–3 lutego 2007 r., Szczecin. Organizatorzy: Klinika Neonatologii PAM, Polskie Towarzystwo Neonatologiczne, Oddział Zachodniopomorski.
- **IV POLSKO-NIEMIECKIE SYMPOZJUM CHIRURGII RĘKI** – 13–14 kwietnia 2007 r., Szczecin. Organizatorzy: Klinika Chirurgii Ogólnej i Chirurgii Ręki PAM, Oddział Chirurgii Ręki w Schwerinie.
- **SYMPOZJUM Z OKAZJI 50-LECIA ZAKŁADU MEDYCYNY NUKLEARNEJ – NAJNOWSZE TRENDY W ZAKRESIE DIAGNOSTYKI I TERAPII RADIOIZOTOPOWEJ** – 19–22 kwietnia 2007 r., Szczecin. Organizatorzy: Zakład Medycyny Nuklearnej PAM, European School of Nuclear Medicine, European Association of Nuclear Medicine, Polskie Towarzystwo Medycyny Nuklearnej.
- **AUTYZM – PROBLEMY MEDYCZNE, PSYCHOLOGICZNE I SPOŁECZNE** – 18–19 maja 2007 r., Szczecin. Organizatorzy: Samodzielna Pracownia Pielęgniarstwa Rodzinnego PAM.
- **VI POMORSKIE WARSZTATY ALERGOLOGICZNE** – 18–20 maja 2007 r., Kołobrzeg. Organizatorzy: Zakład Alergologii Klinicznej PAM, Oddział Przewlekłych Chorób Płuc i Alergii ZOZ nad Matką i Dzieckiem w Gdańsku.
- **SYMPOZJUM ORTOPEDII DZIECIĘCEJ** – 24–26 maja 2007 r., Międzyzdroje. Organizatorzy: Katedra i Klinika Ortopedii Dziecięcej.
- **BLIŹNIĘTA W RÓŻNYCH OKRESACH ŻYCIA: ASPEKTY BIOLOGICZNE, MEDYCZNE, PSYCHOLOGICZNE I SPOŁECZNE** – maj 2007 r., Szczecin. Organizatorzy: Klinika Medycyny Matczyno-Płodowej PAM, Polskie Towarzystwo Gemeliologiczne.
- **XLII ZJAZD POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO** – 18–21 września 2007 r., Szczecin. Organizator: Oddział Szczeciński Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.
- **WSPÓŁCZESNE MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA LEKÓW BIOLOGICZNYCH W LECZENIU WYBRANYCH SCHORZEŃ W CHIRURGII STOMATOLOGICZNEJ** – październik 2007 r., Szczecin. Organizatorzy: Samodzielna Pracownia Farmakoekonomiki PAM, Zakład Chirurgii Stomatologicznej PAM.
- **NOWOTWORY DZIEDZICZNE – PROFILAKTYKA** – październik 2007 r., Międzyzdroje – Szczecin. Organizatorzy: Międzynarodowe Centrum Nowotworów Dziedzicznych PAM, Ogólnopolskie Stowarzyszenie Wspierania Rodzin z Predyspozycjami do Nowotworów Dziedzicznych.