

**GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY**

Iwona Inkielewicz-Stepniak

**Interakcje fluorków z wybranymi składnikami diety  
i farmakoterapeutykami – rola stresu oksydacyjnego**

Rozprawa habilitacyjna

Katedra i Zakład Chemii Medycznej  
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
Kierownik: Prof. dr hab. Michał Woźniak

Gdańsk 2012

Wydano za zgodą  
Senackiej Komisji Wydawnictw  
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Wydawca: Gdański Uniwersytet Medyczny  
Druk: Dział Wydawnictw GUMed  
Gdańsk, ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a  
Zlecenie KW/59/12

*Składam serdeczne podziękowania Profesorom:  
Michałowi Woźniakowi, Markowi Radomskiemu i Jerzemu Krechniakowi  
za stworzenie warunków do realizacji tej pracy oraz ogromną zyczliwość  
w trakcie jej powstawania*



## SPIS TREŚCI

### WYKAZ PUBLIKACJI BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY

HABILITACYJNEJ .....	7
1. WSTĘP.....	9
1.1. Źródła ekspozycji na związki fluoru .....	10
1.2. Ogólnoustrojowe działanie fluorków .....	11
2. CEL PRACY .....	14
3. NAJWAŻNIEJSZE WYNIKI OPUBLIKOWANYCH PRAC .....	15
3.1. Wpływ wybranych czynników żywieniowych i farmakoterapeutycznych na komórkową i narządową toksyczność fluorków - rola stresu oksydacyjnego (publikacje 1-5) .....	15
3.2. Potencjalne źródła narażenia na fluorki (publikacje 6-7) .....	20
4. PODSUMOWANIE .....	23
5. WNIOSKI .....	24
6. PIŚMIENNICTWO .....	25
7. OPUBLIKOWANE PRACE STANOWIĄCE PRZEDMIOT ROZPRAWY HABILITACYJNEJ .....	29



## **WYKAZ PUBLIKACJI BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY HABILITACYJNEJ**

1. Inkielewicz I., Rogowska M., Krechniak J.: Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in rats exposed to fluoride and ethanol. *Fluoride* 2006, 39, 53-59. IF: 1,611.
2. Inkielewicz I., Czarnowski W.: Oxidative stress parameters in rats exposed to fluoride and aspirin. *Fluoride* 2008, 41, 76-82.
3. Inkielewicz-Stepniak I., Czarnowski W.: Oxidative stress parameters in rats exposed to fluoride and caffeine. *Food Chem. Toxicol.* 2010, 48, 1607-1611. IF: 2,602.
4. Inkielewicz-Stepniak I., Radomski M., Wozniak M.: Fisetin prevents fluoride- and dexamethasone-induced oxidative damage in osteoblast and hippocampal cells. *Food Chem. Toxicol.* 2012, 50, 583-589. IF: 2,602.
5. Inkielewicz-Stepniak I., Knap N.: Effect of exposure to fluoride and acetaminophen on oxidative/nitrosative status of liver and kidney in male and female rats. *Pharmacol. Rep.* 2012, 64, 4. (praca przyjęta do druku) IF: 2,5.
6. Malinowska E., Inkielewicz I., Czarnowski W., Szefer P., Assessment of fluoride concentration and daily intake by human from tea and herbal infusions. *Food Chem. Toxicol.* 2008, 46, 1055-1061. IF: 2,321.
7. Inkielewicz-Stepniak I.: Impact of fluoxetine on liver damage in rats. *Pharmacol. Rep.* 2011, 63, 441-447. IF: 2,5.

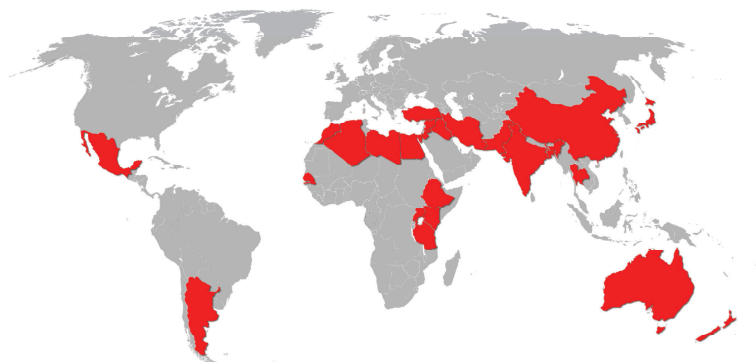




## 1. WSTĘP

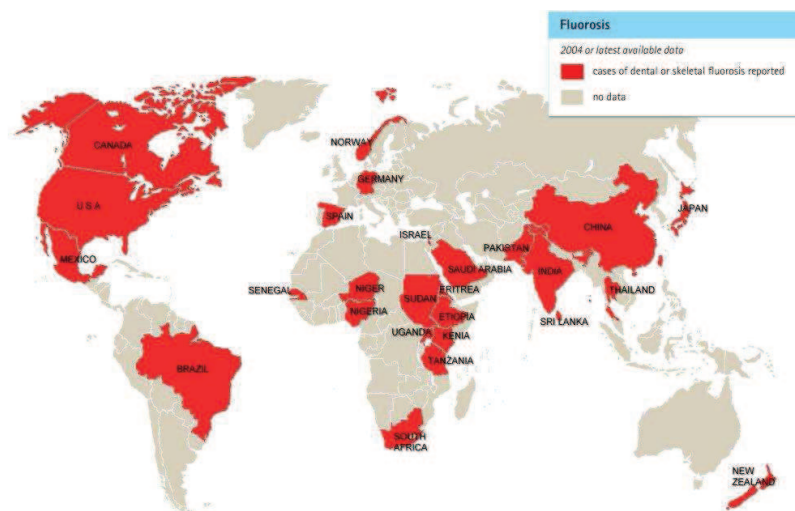
Powszechnie znany jest korzystny wpływ fluorków na organizm człowieka dzięki jego właściwościom przeciwpróchnicznym. Jednak nadmierna ekspozycja na związki fluoru prowadzi do pojawienia się schorzenia zwanego *fluorozą*. Do niedawna termin ten wiązano jedynie z zaburzeniami w układzie kostno-szkieletowym. Obecnie jednak wiadomo, że fluoroza jest schorzeniem ogólnoustrojowym i powoduje zmiany morfologiczne oraz zaburzenia funkcji wszystkich narządów. Fluorki łatwo pokonują bariery ustrojowe, wpływają na przemiany metaboliczne w wyniku wielokierunkowego i złożonego mechanizmu działania. O ile mechanizm szkodliwego działania związków fluoru na tkankę kostną jest dobrze poznany i szeroko opisany to ich ogólnoustrojowy niekorzystny wpływ nadal budzi liczne kontrowersje i tym samym przyciąga uwagę badaczy.

Uważa się, że nadmierne stężenie związków fluoru w wodzie do picia, występujące w wielu regionach świata (ryc. 1), jest głównym czynnikiem powstawania fluorozy.



Ryc. 1. Występowanie fluorozy na świecie wskutek narażenia na podwyższone ( $> 1,5 \text{ mg F}^-/\text{l}$ ) stężenia fluorków w wodzie pitnej ([1] z własną modyfikacją)

Natomiast dane Światowej Organizacji Zdrowia z roku 2004 wskazują, że na występowanie tego schorzenia mogą wpływać również inne czynniki, wśród których należałoby uwzględnić m.in. składniki diety oraz środki farmakologiczne (ryc. 2).



Ryc. 2. Występowanie fluorozy na świecie ([2] z własną modyfikacją)

Wiadomo, że w naturalnych warunkach organizm człowieka narażony jest na działanie nie jednej a kilku substancji jednocześnie, czego wynikiem może być pojawienie się zupełnie nowego działania, zarówno korzystnego jak i szkodliwego, którego nie obserwujemy przy ekspozycji na pojedynczą substancję.

Niniejsze badania po raz pierwszy podejmują próbę kompleksowej analizy interakcji wybranych składników diety i farmakoterapeutyków na komórkową i narządową toksyczność fluorków z uwzględnieniem roli stresu oksydacyjnego.

Z uwagi na wszechobecność związków fluoru w środowisku człowieka bardzo ważne są badania, które dostarczają informacji na temat źródeł tego pierwiastka, które w istotny sposób mogą wpływać na ilość przyswajanych fluorków i w efekcie stanowić zagrożenie zdrowotne. Zwraca również uwagę ogromna popularność zastosowania związków fluoropochodnych w medycynie. Wiadomo, że niektóre z tych związków ulegają metabolizmowi z uwolnieniem jonu fluorkowego, co tym samym może potęgować ich szkodliwe działanie na komórki i tkanki.

Przedstawiona rozprawa stanowi istotne uzupełnienie o nowe informacje na temat źródeł narażenia na związki fluoru.

## 1.1. Źródła ekspozycji na związki fluoru

Obok bezpośrednich ekspozycji przemysłowych, zawodowych oraz endemicznych, coraz więcej danych wskazuje na wzrost zawartości fluorków w produktach żywnościowych. Skorkowska-Zieleniewska i wsp. [3] twierdzą, że człowiek najłatwiej przyswaja fluorki z wody i napojów (60%) oraz z produktów żywnościowych (35%). Dobowa dawka fluorków pobierana z pożywieniem szacowana jest na około 1,70-4,75 mg, natomiast po doliczeniu fluorku z fluorkowanej wody pitnej na 3,5-5,5 mg, a w niektórych krajach może osiągać nawet 27 mg. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia z 2002 roku, zalecane dzienne pobranie dla fluorków wynosi 0,05 mg/kg masy ciała [4]. Zawartość fluorków w żywności zależy od wielu czynników środowiskowych oraz sposobu jej produkcji i przeciętnie waha się w granicach 0,01 do 1,00 mg/kg. Wyjątek stanowią owoce morza i ryby (6-27 mg/kg) i herbata (4-400 mg/kg), które jako stałe składniki diety mogą stanowić istotne źródło narażenia na fluorki [5]. Powszechnie wiadomo, że czynniki żywieniowe mogą modyfikować wchłanianie fluorków i tym samym wywierane przez nie działanie ogólnoustrojowe [4, 5].

Wiadomo, że rośliny z rodziny *Theaceae* kumulują fluor pobierany z gleby i powietrza, co niekiedy prowadzi do wzrostu jego stężenia w liściach powyżej 400 mg/kg [5]. Herbata, jako jeden z najpopularniejszych napojów może więc stanowić poważne źródło tego pierwiastka. Badania, przeprowadzone w 1997 roku przez Food Standards Agency [6] dowodzą, że dzienne pobranie fluorków zależy głównie, nawet w 85% od ilości wypijanych napojów, przede wszystkim herbaty. Światowa produkcja herbaty w 2007 roku osiągnęła prawie 4 mln ton [7]. Jej dobroczynny wpływ na zdrowie został już ponad pięć tysięcy lat temu doceniony przez Chińczyków i Japończyków. Obecnie wiadomo, że liście herbaty zawierają ok. 300 różnych związków, w tym niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Badania wykazujące obecność takich związków jak polifenole, witaminy, mikroelementy, tanina, kofeina zachęcają do codziennego spożywania herbaty. Umiarkowane picie herbaty ma szereg korzyści dla zdrowia, niektórzy twierdzą, że zapobiega między innymi próchnicy zębów. Kłodka i wsp. [8] stwierdzili też, że zawartość fluorków w naparach herbacianych wykazuje dodatnią korelację z zawartością ryboflawiny. Ryboflawina wchodzi w skład wielu koenzymów enzymów oksydoredukcyjnych (np. reduktazy glutationowej), mogących chronić przed uszkodzeniami wolnorodnikowymi. Jednak nadmierne spożywanie herbaty o wysokiej zawartości fluorków, może sprzyjać powstawaniu fluorozy, zwłaszcza w

krajach, w których woda pitna zawiera podwyższone stężenia tego pierwiastka. Fluorozę, powstałą w wyniku nadmiernego pobierania fluorków z herbatą zanotowano w Wielkiej Brytanii, Tybecie i w Indiach [9, 10].

Innym źródłem ekspozycji na fluorki, któremu poświęcono znacznie mniej uwagi są związki fluoroorganiczne. Początek organicznej chemii fluoru przypada na lata dziewięćdziesiąte XIX wieku, kiedy to belgijski chemik Swarts przeprowadził wymianę atomów chlorowców w chlorowcowęgłowodorach na fluor ("Swarts reaction") [11]. Obecnie, związki te znajdują zastosowanie niemal we wszystkich dziedzinach naszego życia, jako środki ochrony roślin, barwniki, polimery, freony oraz leki. Fluoropochodne stosowane są jako anestetyki wziewne, leki przeciwgrzybiczne, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwzapalne, przeciwmalaryczne, leki obniżające poziom cholesterolu, przeciwnowotworowe a także przeciwdepresyjne i przeciwłękowe. Wprowadzenie atomu fluoru usprawnia nie tylko właściwości farmakologiczne ale również wpływa na toksyczność powstałych związków. Korzyści, które wynikają ze stosowania związków fluoropochodnych w medycynie są powszechnie znane, znacznie mniej uwagi poświęca się zagrożeniom związanym z ich stosowaniem. Jednym z efektów ubocznych obserwowanym przy stosowaniu leków fluoropochodnych jest działanie nefrotoksyczne i hepatotoksyczne [12, 13, 14]. Szeroko opisywane toksyczne działanie fluorowanych anestetyków wziewnych wiązano m.in. z ich metabolizmem przy udziale cyt. P450, prowadzącym do wzrostu jonów fluorkowych w surowicy. Stężenie fluorków w surowicy po podaniu metoksyfluranu, enfluranu, sewofluranu osiągało 10-50  $\mu\text{mol/l}$ , a nawet 250  $\mu\text{mol/l}$ . Przy czym już przy stężeniu 22  $\mu\text{mol/l}$  w surowicy utrzymującym się przez 18 godz. obserwowano działanie toksyczne na nerki [15]. W 1974 roku Gottlieb i Trey [16] opisali, że śmiertelność wskutek uszkodzenia wątroby w przypadku enfluranu wynosi 21%, metoksyfluranu 58% i halotanu ok. 50%.

## 1.2. Ogólnoustrojowe działanie fluorków

Fluorki należą do związków, które budzą liczne kontrowersje między badaczami. Spowodowane jest to głównie wąskim marginesem między stężeniem tolerowanym przez organizm a stężeniem, które powoduje wystąpienie działania toksycznego. Nadal trwają spory czy fluor jest pierwiastkiem niezbędnym, nie są bowiem znane choroby o etiologii związanej z jego niedoborem w organizmie. Wprowadzone w 1945 roku w Stanach Zjednoczonych fluorowanie wody pitnej jako tani i skuteczny sposób przeciwdziałania próchnicy zębów również spotyka się z szeroką krytyką. Istnieją nawet badania, według których fluorowanie wody wodociągowej nie zapobiega próchnicy zębów a wskutek niekontrolowanego dziennego pobrania może być przyczyną fluorozy [4, 5]. Przypadki fluorozy zębowej opisywane są przy spożywaniu wody wodociągowej zawierającej większe stężenie niż 1,5 mg F/l. Fluorozę szkieletowa obserwuje się już przy przewlekłym narażeniu na 4-6 mg F/l wody pitnej. Natomiast w strefach klimatu suchego i gorącego, ze względu na duże spożycie wody, fluoroza szkieletowa występuje już przy stężeniu 1,5 mg F/l [5, 17].

Obecnie, duże zainteresowanie badaczy przyciągają mechanizmy i efekty działania fluorków na tkanki miękkie, które nie kumulują fluorków, jednak przy stałym ich dopływie są nimi w sposób ciągły nasycane. Liczne badania dowodzą, że najwyższe stężenie fluorków w tkankach miękkich występuje w nerkach. Ze względu na selektywną absorpcję fluorków oraz ich kinetykę dystrybucji w organizmie nerki są narządem szczególnie narażonym na toksyczne działanie fluorków. Związki fluoru wydalane są bowiem z organizmu głównie z moczem, niewielka ilość z potem, kałem, śliną i mlekiem. Około 20% wchłoniętej dawki wydalą się z moczem po 3 godz., zaś 50% po 24 godz. [17]. W związku z tym składniki diety

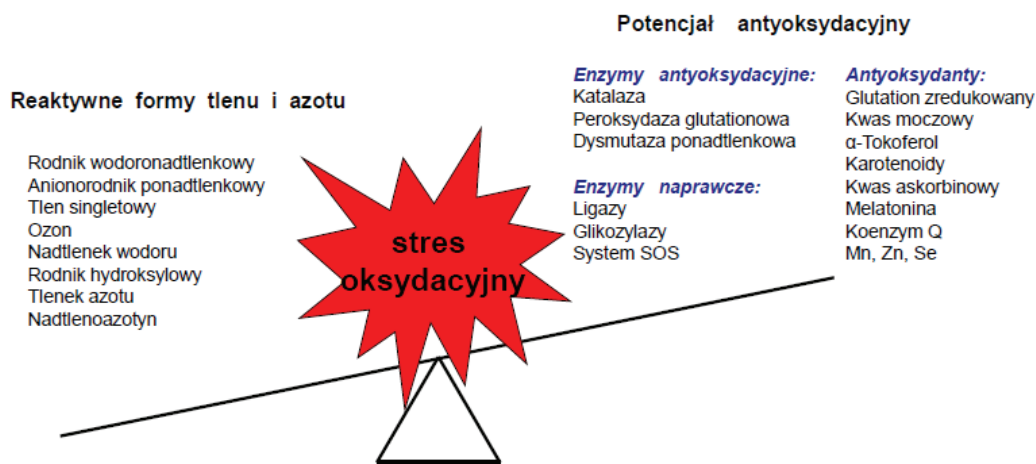
czy też leki, które zmniejszają wydalanie fluorków z moczem mogą tym samym nasilać ich toksyczne ogólnoustrojowe działanie. Oznaczanie stężenia fluorków w moczu stosuje się w monitoringu narażenia na związki fluoru. Dopuszczalne stężenie biologiczne (DSB) dla fluorków w moczu wynosi 3-4 mg/g kreatyniny.

Wiadomo, że fluorki przenikają barierę krew-mózg, krew-łożysko i mogą wywierać szkodliwy efekt już w życiu płodowym [18]. Działanie hepatotoksyczne, nefrotoksyczne, kardiotoxyczne, organicznych i nieorganicznych związków fluoru udokumentowane jest licznymi badaniami [5, 10, 13, 15, 19]. Fluorki wykazują szereg zmian morfologicznych oraz zaburzenia metaboliczne i czynnościowe we wszystkich narządach, uszkodzają gruczoły dokrewne [5, 17]. Na początku lat 90. ubiegłego stulecia ukazała się bardzo duża liczba prac opisujących wpływ fluorku na ośrodkowy układ nerwowy. Niektórzy badacze dowodzą, że fluorek już w stężeniu 1 mg/l (jeszcze przed pojawieniem się fluorozę zębowej) wywołuje szkodliwe działanie na tkankę mózgową [20]. U dzieci z endemiczną fluorozą zaobserwowano obniżenie ilorazu inteligencji, zaburzenia zdolności uczenia się, koncentracji i zapamiętywania, co dowodzi działania szkodliwego w obrębie komórek hipokampa [21]. U pracowników narażonych na związki fluoru stwierdzono zaburzenia w ośrodkowym układzie nerwowym [22].

Szkodliwy efekt związków fluoru na organizm człowieka jest wynikiem bardzo złożonego i nadal nie do końca wyjaśnionego mechanizmu działania.

Wiadomo, że fluorki wywierają ogromny wpływ na szereg procesów zachodzących w organizmie: przemianę węglowodanową, lipidową i białkową, zmieniają aktywność wielu enzymów, mogą być ich inhibitorami jak i aktywatorami, odgrywają rolę inhibitorową w procesach odpowiedzialnych za oddychanie wewnątrzkomórkowe.

Wśród mechanizmów uczestniczących w działaniu toksycznym farmakoterapeutyków i składników diety, w tym fluorków wymienia się stres oksydacyjny. W 1985 roku Sies [23] zdefiniował *stres oksydacyjny* jako nadmierne przesunięcie równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej w kierunku reakcji utleniania (ryc. 3).



Ryc. 3. Stres oksydacyjny – zaburzenie równowagi pomiędzy reaktywnymi formami tlenu, azotu i potencjałem antyoksydacyjnym w komórce

W ciągu ostatnich lat udowodniono, że reaktywne formy tlenu (RFT) i azotu (RFA) reagują w sposób niespecyficzny ze składnikami komórki, prowadząc do ich uszkodzenia [24]. W przedstawionym cyklu prac składających się na niniejszą rozprawę oznaczano

głównie produkty utleniania lipidów, białek, które mogą być jakościowo i ilościowo zmierzone w materiale biologicznym, stanowiąc tym samym wskaźnik nasilenia stresu oksydacyjnego w organizmie oraz wybrane elementy bariery antyoksydacyjnej [23, 24].

## 2. CEL PRACY

Celem doniesień ujętych w rozprawie było określenie wpływu wybranych składników diety i środków farmakoterapeutycznych na komórkową i narządową toksyczność fluorków z uwzględnieniem roli stresu oksydacyjnego oraz dostarczenie informacji na temat (potencjalnych) źródeł narażenia na związki fluoru.

Poniżej przedstawiono szczegółowe cele zrealizowane w cyklu badań stanowiących niniejszą rozprawę habilitacyjną:

1. Określenie wpływu fluorków i etanolu, fluorków i aspiryny, fluorków i kofeiny, fluorków i paracetamolu podawanych łącznie i oddzielnie na wybrane wskaźniki stresu oksydacyjnego w modelu *in vivo*.
2. Określenie roli stresu oksydacyjnego w toksycznym działaniu fluorków i deksametazonu, przy ekspozycji łącznej i oddzielnej na komórki hipokampa i osteoblastów w warunkach *in vitro*.
3. Określenie działania ochronnego flawonoidów (fizetyny) na komórki hipokampa i osteoblastów podczas ekspozycji na fluorki i/ lub deksametazon.
4. Określenie wpływu badanych ksenobiotyków: etanolu, aspiryny, kofeiny, paracetamolu na dystrybucję/ wydalanie fluorków z moczem.
5. Określenie wpływu paracetamolu i/ lub fluorków na parametry stresu oksydacyjnego/ nitrozacyjnego w wątrobie i nerkach zwierząt w zależności od płci.
6. Określenie stężenia fluorków w naparach herbaty i ocena ryzyka ekspozycji na fluorki przy spożywaniu herbaty.
7. Określenie wpływu fluoksetyny – leku fluoropochodnego na poziomy fluorków w surowicy i moczu szczurów.
8. Określenie roli stresu oksydacyjnego w hepatotoksycznym działaniu fluoksetyny w modelu *in vivo*.

### 3. NAJWAŻNIEJSZE WYNIKI OPUBLIKOWANYCH PRAC

#### 3.1. Wpływ wybranych czynników żywieniowych i farmakoterapeutycznych na komórkową i narządową toksyczność fluorków - rola stresu oksydacyjnego (publikacje 1-5)

Przedstawiony cykl prac wyjaśnia, w jaki sposób wybrane składniki diety oraz farmakoterapeutyki wpływają na peroksydację lipidów, białek, elementy bariery antyoksydacyjnej oraz dystrybucję i wydalanie fluorków z moczem w modelu eksperymentalnej fluorozy, obejmując badania *in vitro* i *in vivo*. Przy wyborze czynników żywieniowych i farmakoterapeutycznych kierowałam się przede wszystkim „powszechnością” ich stosowania/ spożywania jak i ich potencjalną cytotoksycznością, toksycznością narządową lub właściwościami antyoksydacyjnymi. Stopień ekspozycji na fluorki, który zastosowałam w doświadczeniach *in vivo* odpowiada ekspozycji spotykanej w warunkach narażenia indywidualnego i populacyjnego [4].

Poniżej opisałam najważniejsze wyniki i tezy wynikające z przeprowadzonych doświadczeń. Szczegółowe omówienie warunków doświadczeń, zastosowanych metod i wyników badań przedstawione zostało w załączonych pracach.

Nadmierne spożywanie **etanolu** zajmuje szczególne miejsce wśród problemów społecznych oraz społeczno-zdrowotnych i może dotyczyć zarówno osób narażonych zawodowo jak i endemicznie na związki fluoru. Wiadomo, że etanol zaburza wchłanianie składników odżywczych w tym licznych pierwiastków, ponieważ uszkodza nabłonek wyścielający przewód pokarmowy. W trakcie metabolizmu etanolu w komórkach generowane są wolne rodniki tlenowe, rodnik hydroksyetylowy i etoksyłowy [25]. Produkcja RFT jest powiązana z aktywacją mikrosomalnego systemu utleniania MEOS (*Microsomal Ethanol Oxidizing System*), który uczestniczy w metabolizmie etanolu. W utlenianiu etanolu ważną rolę odgrywa mechanizm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-zależny, w którym uczestniczy reduktaza NADPH cytochromu c oraz mechanizm o mniejszym znaczeniu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-niezależny, który odbywa się przy udziale cytochromu P450 [25]. Jednak dane dostępne w literaturze dotyczące wpływu etanolu na stres oksydacyjny, zwłaszcza składniki systemu antyoksydacyjnego nie są spójne. Niektórzy autorzy twierdzą, że etanol obniża potencjał antyoksydacyjny komórki [26], inni, że zwiększa aktywność enzymów antyoksydacyjnych [27], jeszcze inni, że nie ma wpływu na poziom glutationu zredukowanego (GSH) i enzymów uczestniczących w jego utlenianiu i redukcji [28]. W związku z tym postanowiliśmy prześledzić [pub. 1] efekt podawania fluorków lub /i etanolu na aktywność katalazy (CAT) oraz poziom GSH i produktów peroksydacji lipidów reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w wątrobie, nerkach mózgu i krwi/ osoczu szczurów. Zbadaliśmy również wpływ etanolu na dystrybucję fluorków w organizmie oraz ich wydalanie z moczem. Fluorek sodu (25 mg/l) podawany był przez 4 tygodnie z wodą do picia, natomiast etanol sondą dożołądkowo (5 g/kg masy ciała) przez ostatnie 14 dni prowadzonego eksperymentu. Stężenie etanolu wybrano na podstawie przeglądu danych literaturowych [26, 29]. W grupie zwierząt otrzymujących etanol, stwierdziliśmy wzrost zawartości fluorków w wątrobie i nerkach, natomiast w grupie narażanej łącznie na fluorki i etanol wzrost stężenia fluorków w mózgu szczurów w porównaniu z grupą narażaną jedynie na fluorek. Obserwowane zmiany w dystrybucji fluorków spowodowane były prawdopodobnie wywołanym przez etanol wzrostem przepuszczalności błon komórkowych. Stwierdziliśmy, że zarówno fluorki jak i etanol nasilają stres oksydacyjny w czasie powtarzającej się ekspozycji i tym samym mogą

wywoływać uszkodzenie tkanek poprzez generowanie wolnych rodników. W wątrobie, nerkach i erytrocytach zwierząt otrzymujących etanol zaobserwowaliśmy wzrost aktywności CAT w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast u szczurów eksponowanych na działanie fluorków aktywność tego enzymu obniżyła się. Może to być spowodowane zaburzeniami w szlaku biotransformacji etanolu, który odbywa się przy udziale katalazy [30]. Z kolei wzrost aktywności enzymu w erytrocytach może stanowić mechanizm ochronnego działania przed indukowanym etanolem stresem oksydacyjnym [31]. Koechling i Amit [32] stwierdzili dodatnią korelację pomiędzy aktywnością katalazy w erytrocytach i ilością wypijanego etanolu. Z drugiej strony, obniżenie aktywności enzymu w wątrobie, mózgu i nerkach zwierząt eksponowanych na działanie fluorków może być wynikiem unieczynnienia enzymu w wyniku nadmiernej produkcji rodników tlenowych w mitochondriach [33]. Zarówno etanol jak i fluorki zmniejszają poziom grup sulfhydrylowych oraz powodują wzrost produktów peroksydacji lipidów w badanych tkankach w porównaniu z grupą kontrolną. Łączne narażenie na oba ksenobiotyki powoduje nasilenie utleniania lipidów komórkowych we wszystkich tkankach w porównaniu z grupą otrzymującą etanol natomiast w nerkach również w porównaniu z grupą narażaną na fluorek.

Nasze badania [pub. 1] po raz pierwszy wskazują na synergizm w toksycznym działaniu fluorków i etanolu wyrażony nasileniem utleniania lipidów w nerkach.

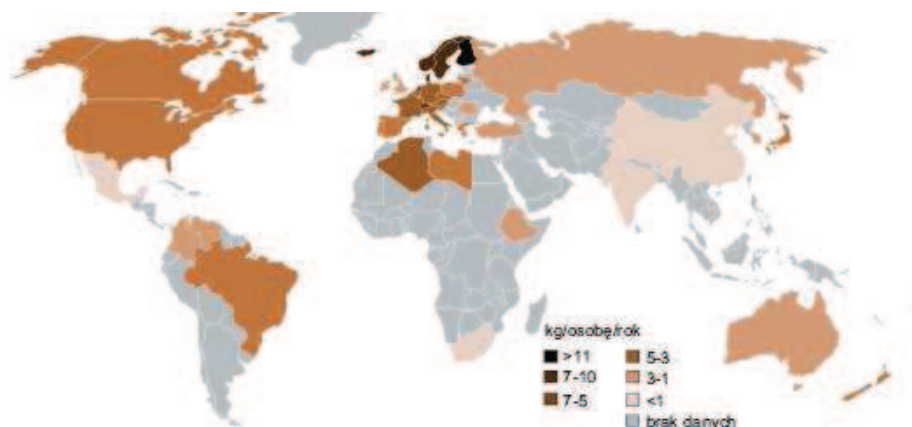
**Aspiryna** (kwas acetylosalicylowy) jest najbardziej popularnym lekiem na całym świecie. Jest powszechnie stosowana ze względu na swoje działanie: przeciwbólowe, przeciwzapalne, przeciwgorączkowe, hamujące agregację płytek krwi, a jej produkcja sięga rocznie 50 tys. ton [34]. W związku z tym, jak również ze względu na brak informacji w literaturze, w kolejnych badaniach [pub. 2] postanowiliśmy prześledzić nasilenie stresu oksydacyjnego w krwi/ surowicy, nerkach, wątrobie i mózgu szczurów eksponowanych 6 tygodni na działanie fluorku i aspiryny. W tym celu oznaczono aktywność peroksydazy glutationowej (GPx), CAT, stężenie GSH i stężenie produktów peroksydacji lipidów. Fluorek sodu (25 mg/l) podawany był z wodą do picia, natomiast aspiryna raz dziennie sondą dożołądkowo w stężeniu 35 mg/kg masy ciała, ( $LD_{50} = 200$  mg/kg m.c.). Odkąd wiadomo, że wolne rodniki są generowane podczas syntezy prostaglandyn – aspiryna, która hamuje szlak cyklooksigenazowy w biosyntezie prostaglandyn, zaliczona została do związków, które chronią elementy komórki przed utlenianiem [35]. Przypuszczano, że aspiryna zapobiega utlenianiu LDL (*low density lipoproteins*), co stanowi jeden z mechanizmów jej przeciwmiażdżycowego działania [36]. Pojawiły się jednak badania, które przedstawiały, że lek ten nasila peroksydację lipidów i wywiera niekorzystny efekt na system antyoksydacyjny komórek [37]. Z drugiej strony Kuhn i wsp. [38] twierdzą, że aspiryna jest „zmiataczem” wolnych rodników, przez co wykazuje terapeutyczny efekt w chorobach krążenia. Natomiast McGahan [39] stwierdził, że leczenie aspiryną zwiększa aktywność antyoksydacyjną w osoczu.

Otrzymane przez nas wyniki wskazują, że zarówno fluorek jak i aspiryna powodują zmiany aktywności/ stężeń badanych elementów bariery antyoksydacyjnej. Zaobserwowaliśmy, że aspiryna zwiększa stężenie GSH w tkankach, z wyjątkiem mózgu. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdziliśmy, że łączna ekspozycja na fluorki i aspirynę powoduje statystycznie znamienne obniżenie aktywności GPx, stężenia GSH w wątrobie, mózgu i krwi oraz aktywności CAT w wątrobie w porównaniu z grupą eksponowaną na działanie aspiryny. Jednocześnie w porównaniu z grupą narażaną na fluorki, można wnioskować, że aspiryna, zwłaszcza w nerkach, łagodzi działanie niekorzystne na potencjał antyoksydacyjny, obserwowany przy łącznej ekspozycji na ksenobiotyki. Jednak, zarówno aspiryna, jak i fluorki nasilają peroksydację lipidów w nerkach, mózgu, wątrobie i osoczu.



Wyniki naszych badań [pub. 2], po raz pierwszy wskazują, że łączne narażenie na fluorki i aspirynę znacznie potęguje peroksydację lipidów w narządach zwierząt doświadczalnych. Zaobserwowaliśmy również zmniejszenie wydalania fluorków z moczem w grupie zwierząt narażanych na aspirynę w porównaniu z grupą kontrolną oraz w grupie narażanej łącznie na aspirynę i fluorek w porównaniu z grupą otrzymującą fluorek sodu. Może to wynikać z kompetencyjnego hamowania transportu anionowego w kanalikach nerkowych [40] i znacznie zwiększyć toksyczne działanie fluorków.

**Kofeina** należy do najczęściej stosowanych substancji o działaniu psychoaktywnym. Dzienne spożycie kofeiny mieści się w granicach 3-7 mg/kg masy ciała, natomiast w ciągu roku wynosi ok. 4,5 kg/osobę, a w niektórych krajach nawet 12,2 kg/osobę (ryc. 4) [41].



Ryc. 4. Spożycie kawy na świecie w 2003 roku według Organizacji do Spraw Wyżywienia i Rolnictwa (FAO)

Źródłami kofeiny w diecie są kawa, herbata, kakao, czekolada, wyroby czekoladowe, napoje typu cola, napoje energetyzujące oraz niektóre leki. Badania epidemiologiczne wskazują, że kofeina obniża nasilenie stresu oksydacyjnego. Właściwości antyoksydacyjne kofeiny związane są prawdopodobnie z jej głównymi metabolitami: 1-metyloksantyną i kwasem 1-metylomocznym. Jednak, poza korzystnym działaniem na komórki, kofeina może powodować zaburzenia związane z absorpcją i wydalaniem składników odżywczych, leków, pierwiastków i mikroelementów. Rosso i wsp. [42] oraz Prasanthi i wsp. [43] zasugerowali, że antyoksydacyjne właściwości kofeiny chronią przed rozwojem choroby Alzheimera. Varma i Hedge [44] zaobserwowali, że kofeina chroni soczewkę oka przed szkodliwym wpływem RFT. Lv i wsp. [45] wykazali, że kofeina chroni wątrobę przed toksycznym działaniem etanolu, poprzez hamowanie utleniania lipidów i wzrost aktywności peroksydazy glutationowej oraz dysmutazy ponadtlenkowej. Stwierdzili również, że kofeina hamuje produkcję RFT w komórkach Kupffera. Devasagayam i wsp. [46] wykazali, że kofeina chroni błony komórkowe przed działaniem rodnika hydroksylowego, rodnika nadtlenkowego i tlenu singletowego. Natomiast Olcina i wsp. [47] stwierdzili, że kofeina w dawce 5 mg/kg m.c. nie ma wpływu zarówno na poziom markerów peroksydacji lipidów jak i witamin o właściwościach antyoksydacyjnych: A, E i C. Z kolei Dianzani i wsp. [48] zaobserwowali, że kofeina nasila utlenianie lipidów w wątrobie.

Biorąc pod uwagę powyższe rozbieżności a także powszechną obecność kofeiny w naszej diecie, celem kolejnej pracy [pub. 3] było określenie wpływu fluorków i kofeiny na

parametry stresu oksydacyjnego w surowicy, mózgu, wątrobie i nerkach szczurów oraz wydalanie fluorków z moczem. Fluorek sodu podawany był z wodą do picia (25 mg/l), natomiast kofeina sondą dożołądkowo (4,7 mg/kg masy ciała) przez jeden miesiąc. W trakcie eksperymentu nie zaobserwowaliśmy wpływu kofeiny na wydalanie fluorków z moczem. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdziliśmy, że fluorek nasila produkcję tlenu azotu (NO) mierzoną poziomem azotynów i azotanów w surowicy oraz badanych tkankach. W warunkach fizjologicznych NO jest syntetyzowany przy udziale konstytutywnych izoenzymów syntazy NO (endotelialnej; eNOS i neuronalnej; nNOS) z L-argininy [49]. Ekspresja indukowanej syntazy tlenu azotu (iNOS) prowadzi do nadprodukcji NO i nadtlenoazotynu, które mogą nasilić stres nitrozacyjny w komórkach i tkankach [50]. Stężenie produktów peroksydacji lipidów również wzrosło we wszystkich tkankach zwierząt eksponowanych na działanie fluorku, natomiast poziom antyoksydantów (TAS) obniżył się. Odwrotne wyniki uzyskano w grupie szczurów, które otrzymywały kofeinę. Z kolei w grupie narażanej łącznie na fluorek sodu i kofeinę stwierdzono obniżenie NO w porównaniu z grupą otrzymującą fluorek, natomiast wzrost w surowicy, mózgu, wątrobie i nerkach w porównaniu z grupą narażaną na kofeinę.

Nasze wyniki [pub. 3], po raz pierwszy wskazują, że kofeina chroni mózg przed nadprodukcją NO wywołaną ekspozycją na fluorki. Stwierdziliśmy również, że kofeina podawana zwierzętom w stężeniu terapeutycznym (4,7 mg/kg m.c.) jest skutecznym antyoksydantem i hamuje niekorzystny wpływ fluorków na poziom antyoksydantów w surowicy i mózgu oraz chroni przed utlenianiem lipidów w surowicy, mózgu, wątrobie i nerkach.

Według danych Światowej Organizacji Zdrowia z 2003 roku, **deksametazon** należy do najczęściej przepisywanych leków z grupy glikokortykosterydów [51]. Glikokortykosterydy mają istotne znaczenie farmakologiczne i terapeutyczne, ale badania epidemiologiczne, jak i doświadczalne dowodzą, że deksametazon, podobnie jak fluorki wykazuje szereg działań szkodliwych na kości i mózg, zwłaszcza hipokamp [52]. Terapia deksametazonem zwiększa ryzyko wystąpienie osteoporozy aż u 50% pacjentów [53]. W związku z tym celem kolejnej pracy [pub. 4] było zbadanie wpływu fluorków i/ lub deksametazonu na apoptozę, poziom reaktywnych form tlenu (RFT) oraz NO w liniach komórkowych hipokampa (HT22) i osteoblastów (MC3T3-E1).

W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się badaniom nad rolą naturalnych substancji w prewencji uszkodzeń wywołanych stresem oksydacyjnym. Flawonoidy stanowią grupę związków pochodzenia roślinnego, aktywnych biologicznie w szerokim zakresie, a zarazem wykazujących niewielką toksyczność. Dlatego też ogromna ilość badań prowadzona jest nad możliwością wykorzystania flawonoidów w leczeniu uszkodzeń i chorób o etiopatogenezie wolnorodnikowej. **Fizetyna** jest flawonoidem występującym w owocach, warzywach, orzechach, a także w winie w stężeniu 2-160 µg/ml, przy czym przeciętne dzienne jej spożycie przez człowieka wynosi ok. 400 µg [54]. Jest „zmiataczem” wolnych rodników o dużej aktywności antyoksydacyjnej i przeciwzapalnej. W związku z tym celem niniejszej pracy [pub. 4] było również określenie ochronnej roli fizetyny na HT22 i MC3T3-E1 przeciwko skutkom stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego, który wywołano przez łączne zastosowanie fluorków i deksametazonu.

W pierwszym etapie naszego doświadczenia wykazaliśmy, że zarówno fluorki jak i deksametazon obniżają przeżywalność komórek HT22 i MC3T3-E1 oraz indukują apoptozę w wyniku 72 godz. ekspozycji, w sposób zależny od stężenia, a efekt ten jest spotęgowany w wyniku łącznej ekspozycji. Wiadomo, że apoptoza może być wynikiem nadprodukcji RFT i RFA. W kolejnych etapach naszych badań stwierdziliśmy, że zarówno fluorki jak i deksametazon generują powstawanie RFT (nadtlenku wodoru; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) w badanych liniach

komórkowych, natomiast łączna ekspozycja nasila ten efekt. Zaobserwowaliśmy również, w obecności CAT, która metabolizuje nadtlenek wodoru, znaczne osłabienie apoptozy indukowanej przez fluorki i/ lub deksametazon. Wiele badań wskazuje, że NO pełni ważną rolę w regulacji procesów metabolicznych zachodzących w mózgu i osteoblastach. Jednak nadprodukcja NO wywołuje efekt cytotoksyczny. Wykazaliśmy, że 72-godzinna inkubacja fluorków z komórkami badanych linii spowodowała wzrost stężenia NO. Stwierdziliśmy również, że deksametazon nie miał wpływu na poziom NO. Wiadomo, jednak, że glikokortykosterydy w pierwszym rzędzie hamują ekspresję iNOS [55, 56]. W wyniku łącznej ekspozycji na fluorki i deksametazon stwierdziliśmy wzrost poziomu NO w liniach komórkowych, co wskazuje, że produkcja NO generowana przez fluorki nie była zależna od ekspresji iNOS i może być wynikiem stymulacji nNOS i/lub eNOS. Bergandi i wsp. [18] wykazali, że fluorki nie wpływają na ekspresję iNOS i nNOS, w komórkach ludzkich osteoblastów, natomiast indukują eNOS. W kolejnym etapie naszych badań dowiedliśmy, że w obecności inhibitora syntazy tlenu azotu, N-omega-monometylo-L-argininy (L-NMMA), proces apoptozy indukowany fluorkami jest zmniejszony. Następnie ustaliliśmy, że pre-inkubacja komórek hipokampa i osteoblastów łącznie z katalazą i L-NMMA całkowicie hamuje stymulowaną fluorkami apoptozę. Ten wynik w sposób jednoznaczny wskazuje na udział NO i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w indukowanej fluorkami apoptozie i pozwala na wyeliminowanie innych czynników o działaniu prooksydacyjnym.

Bardzo ważnym elementem naszych badań było wykazanie, że fizetyna skutecznie chroni komórki hipokampa i osteoblastów przed cytotoksycznym efektem fluorków i deksametazonu. Ponadto dowiedliśmy, że fizetyna może być „zmiataczem” RFT, RFA lub też wpływać na aktywność syntazy NO.

Podsumowując, nasze badania [pub. 4] po raz pierwszy określają udział H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i NO w cytotoksycznym działaniu fluorków i deksametazonu podczas ekspozycji połączonej i pojedynczej. Co więcej, nasze wyniki wskazują, że fizetyna znacznie zmniejsza toksyczne działanie tych ksenobiotyków. Stwarza to możliwość wykorzystania fizetyny w terapii ochronnej przeciwko indukowanym przez fluorki i deksametazon oksydacyjnym uszkodzeniom w mózgu i kościach.

**Paracetamol** (acetaminofen) jest jednym z najczęściej stosowanych na świecie środków o działaniu przeciwbólowym i przeciwgorączkowym. W Polsce, od momentu wprowadzenia na rynek, zarejestrowano ok. 700 produktów leczniczych zawierających w swoim składzie paracetamol [57]. Powszechne stosowanie, łatwa dostępność oraz obecność paracetamolu w wielu preparatach złożonych może prowadzić do przekroczenia dawek terapeutycznych i w efekcie uszkodzenia wątroby oraz nerek. Toksyczne uszkodzenie wątroby powstałe na skutek nadmiernego przyjmowania paracetamolu jest jednym z najczęstszych przyczyn ostrej niewydolności wątroby w Stanach Zjednoczonych i Wielkiej Brytanii [58]. Powszechnie wiadomo, że za działanie toksyczne paracetamolu odpowiada powstający w trakcie metabolizmu, bardzo silny utleniacz - *N-acetylo-4-benzo-chinonoimina* (NAPQI) [59]. Toksyczne działanie paracetamolu może być również wynikiem stymulowania indukowanego izoenzymu syntazy tlenu azotu (iNOS) [60]. Z drugiej strony, niektóre badania dowodzą, że paracetamol stosowany w dawkach terapeutycznych wykazuje działanie antyoksydacyjne [59, 61, 62].

Biorąc pod uwagę powszechne stosowanie paracetamolu jako środka o działaniu przeciwbólowym oraz przeciwgorączkowym, kontrowersyjne opinie a także toksyczność narządową celem kolejnej publikacji [pub. 5] było zbadanie roli stresu oksydacyjnego w hepato- i nefrotoksycznym działaniu fluorków i paracetamolu w trakcie ekspozycji połączonej. Powszechnie wiadomo, że płeć jest istotnym czynnikiem wpływającym na właściwości farmakokinetyczne i farmakodynamiczne farmakoterapeutyków. W związku z

tym kolejnym celem naszej pracy [ pub. 5] było zbadanie wpływu fluorków i/ lub paracetamolu na parametry stresu oksydacyjnego/ nitrozacyjnego w zależności od płci. Szczury (samce i samice) eksponowane były przez 6-tygodni na fluorek sodu 12 mg F/l podawany z wodą do picia i/ lub paracetamol podawany w dawce subtoksycznej 150 mg/kg masy ciała ( $LD_{50}=1944$  mg/kg m.c.) sondą dożołądkowo [63]. Nasze badania [pub. 5] jako pierwsze dowodzą, że łączna ekspozycja na paracetamol i fluorki powoduje nasilenie peroksydacji lipidów, wzrost stężenia NO oraz obniżenie poziomu całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (TAS) w nerkach zwierząt w porównaniu z grupami narażanymi na pojedyncze działanie ksenobiotyków. Brak skumulowanego efektu paracetamolu i fluorków na badane parametry stresu oksydacyjnego/ nitrozacyjnego stwierdziliśmy w wątrobie. Jednocześnie nie zaobserwowaliśmy różnic w badanych parametrach w zależności od płci. Wykazaliśmy również, że paracetamol obniża wydalanie fluorków z moczem w trakcie ekspozycji subchronicznej, co może być wynikiem uszkodzenia nerek [64]. Nasze badania [ pub. 5] jednoznacznie wskazują na większe ryzyko pojawienia się działania nefrotoksycznego podczas narażenia na łączne działanie fluorków i paracetamolu w porównaniu z ekspozycją na pojedyncze działanie ksenobiotyków.

### 3.2. Potencjalne źródła narażenia na fluorki (publikacje 6-7)

Znajomość ilości potencjalnie przyswajalnych fluorków ma istotne znaczenie w ocenie jakości zdrowotnej żywności. Zawartość fluorków w naparach herbaty może wynosić nawet 5,2 mg/l [4, 5]. Zaobserwowano, że spożywanie gotowych napojów herbacianych typu „ice tea” stanowi również, zwłaszcza u dzieci niebezpieczeństwo wystąpienia fluorozy [65]. Z tego względu istotnym było sprawdzenie stężenie fluorków w różnych rodzajach herbat, naparach ziołowych oraz napojach herbacianych dostępnych na polskim rynku. Określiśmy również wpływ czasu parzenia 5, 10 i 30 min na stężenie fluorków. Jednocześnie celem pracy było oszacowanie wpływu objętości wypijanych naparów i napojów na dopuszczalne dzienne pobranie SAI (*Safe and Adequate Daily Intake*), które ściśle odpowiada ADI (*Acceptable Daily Intake*) dla człowieka [66]. Obecnie na rynku polskim dostępne są różne rodzaje herbat, czy też napojów herbacianych. Herbata jest to wiecznie zielona roślina z rodzaju kamelia (*Camellia sinensis*). Ze względu na proces fermentacji, któremu poddawane są liście herbaty dzielimy ją na:

- zieloną (*niefermentowana*),
- oolong lub ulung (*półfermentowana*),
- czarną (*fermentowana*).

Poza tym wyróżnia się herbatę białą, produkowaną z młodych pączków, które jeszcze nie zdążyły się rozwinąć oraz herbatę pu-erh – czerwoną, która przechodzi dodatkowy proces fermentacji i leżakowania. Bardzo popularne, ze względu na właściwości są również, niesłusznie nazywane herbatami, napary ziołowe z liści i gałązek Yerba mate (*Ilex paraguariensis*), rooibos – czerwono krzewu afrykańskiego (*Aspalathus linearis*), liści, gałązek i kwiatów miodokrzewu (*Cyclopia intermedia*) oraz napoje herbaciane (*instant tea, ready-to-drink tea beverages*).

W wyniku przeprowadzonych badań [pub. 6] stwierdziliśmy, że stężenie fluorków w naparach herbaty, po 5 min zaparzania, mieściło się w zakresie od najwyższego – 4,54 mg/l w czarnej granulowanej herbacie Ygara, pochodzącej z Afryki do najniższego – 0,37 mg/l w białej herbacie. Zawartość fluorków w herbacie jest wymieniana jako wskaźnik jej jakości [67]. Według naszych badań herbata biała, która należy do najwartościowszych i najdroższych rodzajów zawierała najniższy poziom fluorków. W naparach ziołowych

najwyższe stężenie tego pierwiastka zawierał napar uzyskany z yerba mate – 0,09 mg/l, a najniższy – rooibos: 0,02 mg/l. Należy zaznaczyć, że zawartość fluorków w wodzie wodociągowej użytej w naszych badaniach wynosiła 0,3 mg/l. Stężenie fluorków w napojach herbacianych wynosiło od 0,04 mg/l do 1,65 mg/l. Na zawartość fluorków w naparach herbaty i herbatach ziołowych ma wpływ wiele czynników, między innymi sposób obróbki liści, a także czas ich parzenia [4, 8]. Według naszych badań najwięcej fluorków jest uwalniana z liści herbaty oraz mieszanek ziołowych w ciągu pierwszych 5 minut przygotowywanego naparu. ADI dla fluorków jest zbliżone do wartości wyznaczonych w Polsce (SAI) i mieści się w zakresie 1,5-4,0 mg dla dorosłych i nastolatków oraz 1,5-2,5 mg dla dzieci. Natomiast według danych Światowej Organizacji Zdrowia z roku 2002 wynosi 2-4 mg dla dorosłych i 2 mg dla dzieci. Nasze badania [pub. 6] wskazują, że wypijanie czarnej herbaty, w ilości 5 filiżanek (1000 ml), może spowodować przekroczenie zalecanego dziennego spożycia dla tego pierwiastka, zwłaszcza w przypadku dzieci i tym samym stanowić ryzyko pojawienia się fluorozy. Należy również pamiętać, że spożywana herbata nie jest jedynym źródłem fluoru – jest nim także woda pitna (zwłaszcza w krajach gdzie stosuje się proces jej fluorkowania), pasty do zębów i preparaty stomatologiczne, owoce morza, ryby, ekspozycja zawodowa i środowiskowa.

Wiadomo, że niektóre leki fluoroorganiczne, zarówno alifatyczne jak i aromatyczne (metoksyfluran, enfluran, izofluran 4-fluoro-L-fenylalanina, kwas 3,5-difluoro-4-hydroksybenzoesowy) ulegają w organizmie metabolizmowi między innymi do jonu fluorkowego [14].

Zainteresowały mnie dostępne w literaturze informacje, że 4-trifluorometylofenol – metabolit fluoksetyny, leku o działaniu antydepresyjnym, powoduje wzrost stężenia jonów fluorkowych w zależności od czasu ekspozycji i stężenia [68]. Z tego względu celem prowadzonych przeze mnie badań [pub. 7] było oznaczenie stężenia fluorków w surowicy i moczu zwierząt eksponowanych na działanie fluoksetyny a tym samym sprawdzenie czy fluoksetyna może stanowić źródło fluorków.

**Fluoksetyna** ((±)-*N*-metylo-3-fenyl-3-[4-(trifluorometylo)fenoksy]propano-1-amina), jest bardzo popularnym lekiem przepisywanym w terapii zaburzeń neurologicznych, takich jak depresja czy stany lękowe. Należy do grupy selektywnych inhibitorów wychwytu zwrotnego serotoniny, powszechnie znana jest pod nazwą *Prozac*, czyli „pigulka szczęścia”. Jednym z powikłań obserwowanych w trakcie terapii fluoksetyną jest uszkodzenie wątroby i towarzyszący temu wzrost aktywności enzymów wątrobowych [13]. U pacjentów leczonych fluoksetyną obserwowano również ostre zapalenie wątroby [12]. Jednak mechanizm tego działania jest nieznan. Dlatego drugim celem tej pracy [pub. 7] było prześledzenie wpływu fluoksetyny na wybrane parametry stresu oksydacyjnego w wątrobie. Poznanie mechanizmów związanych z działaniem ubocznym leków jest szczególnie ważne przy terapiach długotrwałych, jak w przypadku zaburzeń neurologicznych. Zgodnie z danymi WHO z 2009 roku depresja zajmuje czwarte miejsce wśród problemów zdrowotnych na świecie [69]. W dostępnej literaturze znajduje się niewiele, przy tym niespójnych, informacji określających wpływ fluoksetyny na parametry stresu oksydacyjnego w wątrobie. Thompson i wsp. [68] stwierdzili, że metabolit fluoksetyny (4-trifluorometylofenol) obniża poziom glutationu w wątrobie. Z drugiej strony Zafir i Banu [70] nie zaobserwowali wpływu fluoksetyny (20 mg/kg m.c.) na potencjał antyoksydacyjny w wątrobie szczurów.

W trakcie prowadzonego eksperymentu nie zaobserwowałam wpływu fluoksetyny na stężenie fluorków w surowicy i moczu. Prawdopodobnie jest to wynikiem stabilnego wiązania między atomem fluoru i węglem w grupie trifluorometylowej (-CF<sub>3</sub>), które występuje w cząsteczce fluoksetyny. Roztwór fluoksetyny w stężeniu 8 i 24 mg/kg m.c./dobę, (LD<sub>50</sub>=452 mg/kg m.c.) przygotowany z chlorowodoru fluoksetyny, podawany był szczurom

sondą dożołądkową raz dziennie przez jeden miesiąc. W wyniku przeprowadzonego doświadczenia stwierdziłam wzrost aktywności dehydrogenazy alaninowej (ALT) dehydrogenazy asparaginianowej (AST) oraz transferazy S-glutationowej (GST) w surowicy, które wskazują na hepatotoksyczne działanie fluoksetyny. Zaobserwowałam również wzrost produktów utleniania białek i lipidów oraz kwasu moczowego w wątrobie. U człowieka kwas moczowy jest metabolitem przemian purynowych w organizmie. Stosowany jest między innymi w diagnostyce chorób serca, nadciśnienia, cukrzycy. Stwierdzono, że wysoki wzrost poziomu kwasu moczowego towarzyszy wzrostowi aktywności ALT w uszkodzeniu wątroby [71]. Kwas moczowy pełni funkcję antyoksydanta albo prooksydanta, jeśli znajdzie się wewnątrz komórek. W obecności RFT lub RFA kwas moczowy jest bardzo szybko degradowany, a produkty jego rozkładu mogą być cytotoksyczne. Obserwowany wzrost stężenia kwasu moczowego wraz ze wzrostem markerów peroksydacji lipidów i białek w wątrobie szczurów wskazuje, że działanie hepatotoksyczne fluoksetyny związane jest z nadprodukcją wolnych rodników i zmianami w układzie antyoksydantów.

Uzyskane przeze mnie wyniki [pub. 7], po raz pierwszy wskazują, na udział mechanizmów wolnorodnikowych w hepatotoksycznym działaniu fluoksetyny. Nie stwierdziłam wzrostu stężenia fluorków w surowicy i moczu zwierząt eksponowanych na chlorowodorek fluoksetyny.

#### 4. PODSUMOWANIE

Prowadzony przez mnie cykl badań ma znaczenie poznawcze i praktyczne. Dostarcza nowych (brakujących w literaturze) informacji z zakresu toksyczności związków fluoru w ekspozycji z wybranymi składnikami diety i środkami farmakoterapeutycznymi łącząc eksperymenty *in vivo* i *in vitro*. Jest to o tyle istotne, iż niemalże całe piśmiennictwo opisujące biologiczne działania związków fluoru dotyczy analizy fluorków jako jedyne go czynnika narażenia.

Z praktycznego punktu widzenia, przeprowadzone badania mogą przyczynić się do wyjaśnienia interakcji fluorków z ksenobiotykami „powszechnie” stosowanymi/ spożywanymi, co umożliwi udoskonalenie sposobów zapobiegania i leczenia działań niepożądanych. Substancje badane jako antyoksydanty (fizetyna, kofeina) w prewencji działań niepożądanych mogą okazać się interesujące ze względu na niski koszt związany z ich wytwarzaniem, tym samym obniżeniem kosztów leczenia a także bezpieczeństwem stosowania.

## 5. WNIOSKI

Przeprowadzone badania i uzyskane wyniki pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Stwierdzono synergizm w toksycznym działaniu fluorków oraz:
  - a. etanolu wyrażony nasileniem peroksydacji lipidów w nerkach.
  - b. aspiryny wyrażony nasileniem peroksydacji lipidów w nerkach, wątrobie, mózgu i osoczu.
  - c. deksametazonu w liniach komórkowych hipokampa i osteoblastów wyrażony nasileniem peroksydacji lipidów, wzrostem stężenia reaktywnych form tlenu i tlenu azotu oraz indukcją apoptozy.
  - d. paracetamolu wyrażony nasileniem peroksydacji lipidów, wzrostem poziomu tlenu azotu i obniżeniem poziomu potencjału antyoksydacyjnego w nerkach.
2. W cytotoksycznym działaniu fluorków w liniach komórkowych hipokampa i osteoblastów uczestniczy nadtlenek wodoru i tlenek azotu.
3. Etanol nasila dystrybucję fluorków do wątroby i nerek. W połączonej ekspozycji z fluorkiem sodu zwiększa dystrybucję fluorków do mózgu. Aspiryna i paracetamol obniżają wydalanie fluorków z moczem.
4. Kofeina jest efektywnym antyoksydantem i hamuje niekorzystny wpływ fluorków na tkanki w badaniach *in vivo*.
5. Fizetyna skutecznie chroni komórki hipokampa i osteoblastów przed oksydacyjnymi uszkodzeniami spowodowanymi ekspozycją na fluorki i deksametazon.
6. Nie stwierdzono różnic w badanych parametrach stresu oksydacyjnego/ nitrozacyjnego w wątrobie i nerkach zwierząt eksponowanych na działanie paracetamolu i/ lub fluorków w zależności od płci.
7. Stężenie fluorków w naparach herbaty zależy od rodzaju herbaty i wzrasta wraz z wydłużaniem czasu parzenia. Czarna herbata zawiera najwyższe stężenia fluorków. Spożywanie czarnej herbaty w ilości powyżej 1000 ml dziennie może stanowić ryzyko pojawienia się fluorozy.
8. W hepatotoksycznym działaniu fluoksetyny uczestniczą mechanizmy wolnorodnikowe. Fluoksetyna nie powoduje wzrostu stężenia fluorków w surowicy i moczu.



## 6. PIŚMIENICTWO

1. [http://www.nofluoride.com/Unicef\\_fluor.cfm](http://www.nofluoride.com/Unicef_fluor.cfm)
2. World Health Organization (WHO): Fluoride and arsenic in drinking water. Geneva, 2004. <http://www.who.int/ceh/publications/en/08fluor.pdf>
3. Skorowska-Zieleniewska J., Roszkowski W., Paprocka M.: Fluor w żywności – problemy higieniczno-żywniowe i analityczne. *Metab. Fluoru*. 1982, 15-19.
4. World Health Organization (WHO): Environmental Health Criteria 227: Fluorides. Geneva, 2002.
5. Kryteria Zdrowotne Środowiska. Fluor i fluorki. T. 36. Warszawa: PZWL, 1989.
6. Food Standards Agency (FSA), 1997 Total Diet Study – Fluorine, Bromine and Iodine. 2000, London: FSA Surveillance Unit, 2000.
7. Alkan I., Köprülü O., Alkan B.: Latest advances in world tea production and trade Turkey's aspect. *World J. Agric. Sci.* 2009, 5, 3, 345-9.
8. Kłodka D., Telesiński A., Bońkowski M.: Określenie zależności pomiędzy zawartością fluoru oraz wybranych witamin w naparach różnych rodzajów herbat. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2008, 4, 41, 957-963.
9. Cao J., Bai X., Zhao Y., Liu J., Zhou D., Fang S., Jia M., Wu J.: The relationship of fluorosis and brick tea drinking in Chinese Tibetans. *Environ. Health Perspect.* 1996, 104, 12, 1340-1343.
10. Webb-Peploe M.M., Bradley W.G.: Endemic fluorosis with neurological complications in a Hampshire man. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 1996, 29, 577-583.
11. Swarts F.: Note sur un nouveau dérivé fluoré du carbone. *Bulletin de l'Académie royale des Sciences, des Lettres et des Beaux-Arts de Belgique*, 1892, 3e, 24, 309-320.
12. Capella D., Bruguera M., Figueras A., Laporte J.: Fluoxetine-induced hepatitis: why is postmarketing surveillance needed? *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1999, 55, 7, 545-546.
13. Castiella A., Arenas J.: Fluoxetine hepatotoxicity. *Am. J. Gastroenterol.* 1994, 89, 3, 458-459.
14. Strunecká A., Patočka J., Connett P.: Fluorine in medicine. *J. Appl. Biomed.* 2004, 2, 141-150.
15. Mazze R.I., Calverley R.K., Smith N.T.: Inorganic fluoride nephrotoxicity: prolonged enflurane and halothane anesthesia in volunteers. *Anesthesiology*. 1977, 46, 4, 265-71.
16. Gottlieb L.S., Trey C.: The effects of fluorinated anesthetics on the liver and kidneys. *Ann. Rev. Med.* 1974, 25, 411-29.
17. Whitford G.M.: The metabolism and toxicity of fluoride. Basel: Karger, 1996.
18. Preis K., Kołodziejczak E., Inkielewicz I., Świątkowska-Freund M., Czarnowski W., Szczapa J.: Influence of fluorine overdosis on skeletal system in rats' offsprings and the possible protective value of calcium and vitamin D<sub>3</sub> diet. *Pol. J. Environ. Stud.* 2008, 17, 4B, 183-143.
19. Bergandi L., Aina V., Malavasi G., Morterra C., Ghigo D.: The toxic effect of fluoride on MG-63 osteoblast cells is also dependent on the production of nitric oxide. *Chem. Biol. Interact.* 2011, 190, 2-3, 179-186.
20. Varner J.A., Jensen Karl F., Horvath W.I., Robert L.: Chronic administration of aluminum-fluoride or sodium-fluoride to rats in drinking water: alterations in neuronal and cerebrovascular integrity. *Brain Res.* 1998, 784, 1-2, 284-298.

21. Zhao L.B., Liang G.H., Zhang D.N., Wu X.R.: Effect of a high fluoride water supply on children's intelligence. *Fluoride*. 1996, 29, 4, 190-192
22. Calvert G.M., Mueller C.A., Fajen J.M., Chrislip D.W., Russo J., Briggle T., Fleming L.E., Suruda A.J., Steenland K.: Health effects associated with sulfuranyl fluoride and methyl bromide exposure among structural fumigation workers. *Am. J. Public Health*. 1998, 88, 12, 1774-1780.
23. Sies H.: Oxidative stress: introductory remarks. W: Sies H. (ed.): *Oxidative Stress*. London: Academic Press, 1985, s. 1-8.
24. Halliwell B., Gutteridge J.M.C.: Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death. W: Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (red): *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Oxford University Press, 2007, s. 246-350.
25. Albano E., Tomasi A., Gorla-Gatti L., Dianzani M.U.: Spin trapping of free radical species produced during the microsomal metabolism of ethanol. *Chem. Biol. Interact.*: 1988, 65, 3, 223-234.
26. Aydin S., Ozaras R., Uzun H., Belce A., Uslu E., Tahan V., Altug T., Dumen E., Senturk H.: N-acetylcystein reduced the effect of ethanol on antioxidant system in rat plasma and brain tissue. *Tohoku J. Exp. Med.* 2002, 198, 2, 71-77.
27. Montoliu C.S., Valles J., Renau-Piqueras and Guerri C.: Ethanol-induced oxygen radical formation and lipid peroxidation in rat brain, effect of chronic alcohol consumption. *J. Neurochem.* 1994, 63, 5, 1855-1862.
28. Omodeo-Sale F., Gramigna D., Campaniello R.: Lipid peroxidation and antioxidant systems in rat brain: effect of chronic alcohol consumption. *Neurochem. Res.* 1997, 22, 5, 577-582.
29. Gable R.S.: Comparison of acute lethal toxicity of commonly abused psychoactive substances. *Addiction*. 2004, 99, 6, 686-696.
30. Aragon C.M.G., Scotland L.M., Amit A.: Studies on ethanol-brain catalase interaction: evidence for central ethanol oxidation. *Alcoholism Clin. Exp. Res.* 1991, 15, 2, 165-169.
31. Temel J., Ozerol E., Bay A., Cigli A., Akyol O.: Erythrocyte catalase activities in alcohol consumption, medications and some diseases. *Inonu Universitesi Tip Facultesi Dergisi*, (cited 2002); 9, 1, 11-14. Available from: 9/Issue1/011114.pdf.
32. Koechling U.M., Amit Z.: A relationship between blood catalase activity and drinking history in a human population, a possible biological marker of the affinity to consume alcohol. *Alcohol Alcohol*. 1992, 27, 2, 181-188.
33. Pigeolet E., Corbisler P., Houbion A., Lamber D., Michiels C.: Glutathione peroxidases, superoxide dismutase and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech. Ageing Dev.* 1990, 51, 3, 283-297.
34. Grosser T., Smyth E.M., FitzGerald G.A.: Anti-inflammatory, antipyretic, and analgesic agents; pharmacotherapy of gout. W: Brunton L.L., Chabner B.A., Knollmann B.C. (red.): *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill Medical, 2011, s. 959-1004.
35. Manjula T.S., Devi C.S.: Effects of aspirin on mitochondrial lipids in experimental myocardial infarction in rats. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1993, 29, 5, 921-928.
36. Steer K.A., Wallace T.M., Bolton C.H., Hartog M.: Aspirin protects low-density lipoprotein from oxidative modification. *Heart*. 1997, 77, 4, 333-337.
37. Kirkova M., Ivancheva E., Russanov E.: Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in aspirin-treated rats. *Gen. Pharmacol.* 1995, 26, 3, 613-617.
38. Kuhn W., Muller T., Buttner T., Gerlach M.: Acetylsalicylic acid as free radical scavenger. An argument for increased dosages in acute and preventive therapy of vascular diseases. *Fortschr. Med.* 1995, 113, 33, 483-484.

39. McGahan MC. Copper and aspirin treatment increase the antioxidant activity of plasma. *Agents Actions*. 1990, 31, 1-2, 59-64.
40. Pritchard J.B., Millers D.S.: Mechanisms mediating renal secretion of organic anions and cations. *Physiol. Rev.* 1993, 73, 4, 765-96.
41. Food and Agriculture Organization of the United Nations 2003. <http://faostat.fao.org/site/609/default.aspx#ancor> (ostatni dostep 10.04.2009).
42. Rosso A., Mossey J., Lippa C.F.: Caffeine: neuroprotective functions in cognition and Alzheimer's disease. *Am. J. Alzheimer's Dis. Other Dement.* 2008, 23, 5, 417-22.
43. Prasanthi J.R.P., Dasari B., Marwarha G., Larson T., Chen X., Geiger J.D., Ghribi O.: Caffeine protects against oxidative stress and Alzheimer's disease-like pathology in rabbit hippocampus induced by cholesterol-enriched diet. *Free Radical Biol. Med.* 2010, 49, 7, 1212-1220.
44. Varma S.D., Hegde K.R.: Kynurenine-induced photo oxidative damage to lens in vitro: protective effect of caffeine. *Mol. Cell Biochem.* 2010, 340, 1-2, 49-54.
45. Lv X., Chen Z., Li J., Zhang L., Liu H., Huang C., Zhu P.: Caffeine protects against alcoholic liver injury by attenuating inflammatory response and oxidative stress. *Inflamm. Res.* 2010, 59, 8, 635-45.
46. Devasagayam T., Kamat J., Mohan H., Kesavan P.: Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta.* 1996, 1282, 1, 63-70.
47. Olcina G. J., Muñoz D., Timón R.M., Caballero J., Maynar J.I., Córdova A., Maynar M.: Effect of caffeine on oxidative stress during maximum incremental exercise. *J. Sports Sci. Med.* 2006, 5, 621-628.
48. Dianzani M., Muzio G., Biocca M., Canuto R.: Lipid peroxidation in fatty liver induced by caffeine in rats. *Int. J. Tissue React.* 1991, 13, 2, 79-85.
49. Palmer R.M., Ashton D.S., Moncada S.: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988, 333, 6174, 664-666.
50. Radomski M.W., Salas E.: Nitric oxide – biological mediator, modulator and factor of injury: its role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1995, 118, 69-80.
51. World Health Organization (WHO): Drugs and therapeutic committee – a practical guide. Geneva, 2003.
52. You, J.M., Yun, S.J., Nam, K.N., Kang, C., Won, R., Lee, E.H.: Mechanism of glucocorticoid-induced oxidative stress in rat hippocampal slice cultures. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2009, 87, 6, 440-447.
53. Gourlay M., Franceschini N., Sheyn Y.: Prevention and treatment strategies for glucocorticoid-induced osteoporotic fractures. *Clin. Rheumatol.* 2007, 26, 2, 144-153.
54. Kimira M., Arai Y., Shimoi K., Watanabe S.: Japanese intake of flavonoids and isoflavonoids from foods. *J. Epidemiol.* 1998, 8, 3, 168-175.
55. Korhonen R., Lahti A., Hämäläinen M., Kankaanranta H., Moilanen E.: Dexamethasone inhibits inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production by destabilizing mRNA in lipopolysaccharide-treated macrophages. *Mol. Pharmacol.* 2002, 62, 3, 698-704.
56. Radomski M.W., Palmer R.M.J., Moncada S.: Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not constitutive nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990, 87, 24, 10043-10047.
57. Baza leków i środków ochrony zdrowia BLOZ, [www.bloz.pl](http://www.bloz.pl), 2011.

58. Lee W.M.: Acetaminophen and the U.S. Acute Liver Failure Study Group: Lowering the risks of hepatic failure. *Hepatology*. 2004, 40, 1, 6-9.
59. Blough E.R., Wu M.: Acetaminophen: beyond pain and Fever-relieving. *Front Pharmacol*. 2011, 2, 72. Epub 2011 Nov 9.
60. McNaughton L., Puttagunta L., Martinez-Cuesta M.A., Kneteman N., Mayers I., Moqbel R., Hamid Q., Radomski M.W.: Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002, 99, 26, 17161-17166.
61. Schildknecht S., Daiber A., Ghisla S., Cohen R.A., Bachschmid M.M.: Acetaminophen inhibits prostanoid synthesis by scavenging the PGHS-activator peroxynitrite. *FASEBJ*. 2008, 22, 215-224.
62. DuBois R.N., Hill K.E., Burk, R.F.: Antioxidant effect of acetaminophen in rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 1983, 32, 2621-2622.
63. Marotta F., Yadav H., Gumaste U., Helmy A., Jain S., Minelli E.: Protective effect of a phytochemical on oxidative stress and DNA fragmentation against paracetamol-induced liver damage. *Ann. Hepatol.* 2009, 8, 50-56.
64. Spencer H, Kramer L, Gatza C, Norris C, Wiatrowski E, Gandhi VC: Fluoride metabolism in patients with chronic renal failure. *Arch. Intern. Med.* 1980, 140, 1331-1335.
65. Behrendt A., Oberste V., Wetzel W.E.: Fluoride concentration and pH of iced tea products. *Caries Res.* 2002, 36, 6, 405-410.
66. Panczenko-Kresowska B., Ziemiański Ś.: Mineral components – their role in human nutrition. W: Ziemiański Ś. (red.): *Human Dietary Standards – Physiological Basis*. Warsaw: Medical Publishing House PZWL, 2001, s. 309-360.
67. Fung K.F., Zhang Z.Q., Wong J.W.C., Wong M.H.: Fluoride contents in tea and soil from tea plantations and the release of fluoride into tea liquor during infusion. *Environ. Pollut.* 1999, 104, 2, 197-205.
68. Thompson D.C., Perera K., London R.: Spontaneous hydrolysis of 4-trifluoromethylphenol to a quinone methide and subsequent protein alkylation. *Chem. Biol. Interact.* 2000, 126, 1, 1-14.
69. World Health Organization (WHO): Mental Health, Depression. [http://www.who.int/mental\\_health/management/depression/definition/en/](http://www.who.int/mental_health/management/depression/definition/en/) (16.09.2009).
70. Zafir A., Banu N.: Antioxidant potential of fluoxetine in comparison to Curcuma longa in restraint-stressed. *Eur. J. Pharmacol.* 2007, 572, 1, 23-31.
71. Afzali A., Weiss N.S., Boyko E.J., Ioannou G.N.: Association between serum uric acid level and chronic liver disease in the United States. *Hepatology*. 2010, 52, 2, 578-589.