

Wpływ czasu ekspozycji i stężenia fluoru na homeostazę komórek

The effects of exposure time and fluorine concentration on cell homeostasis

Ewa Kurzeja^(a, c, e), Katarzyna Pawłowska-Góral^(a, d, e), Marcin Burzyński^(b, c, d),
Karolina Bycina^(b, c, d)

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach,
Katedra i Zakład Żywności i Żywienia. Kierownik: dr hab. K. Pawłowska-Góral

^(a) koncepcja

^(b) zebranie materiału do badań

^(c) badania laboratoryjne

^(d) statystyka

^(e) opracowanie tekstu i piśmiennictwa

STRESZCZENIE

Wstęp. Zawartość fluoru w żywności zależy od obecności jego związków w wodzie, glebie i powietrzu. Duża aktywność jonu fluorkowego i znaczne powinowactwo do metali dwuwartościowych, będących kofaktorami wielu enzymów, może powodować zmiany aktywności tych enzymów skutkujące m.in. zmianami stężenia ATP oraz powstawaniem wolnych rodników w komórce. Celem pracy była ocena wpływu fluoru na wzrost hodowli oraz homeostazę komórek.

Materiał i metody. Badania prowadzono na fibroblastach izolowanych metodą eksplantów tkanki ze skóry pobranej z ogona i brzucha myszy, szczepu BALB/c. Fibroblasty hodowano z dodatkiem fluorku sodu o stężeniu końcowym: 0,03 mmol/l; 0,06 mmol/l i 0,12 mmol/l. Czas hodowli wynosił: 1, 3 i 6 dni. Wyznaczano wskaźnik wzrostu hodowli (N/N_0) oraz oznaczano stężenia: ATP i uwolnionego do pożywki, tlenu azotu. Wyniki przeliczono na 1×10^6 komórek.

Wyniki. Uzyskane wyniki wskazują, że obecność jonów fluorkowych powoduje inhibicję wzrostu hodowli fibroblastów, obniżenie syntezy ATP oraz zmniejszenie wytwarzania tlenu azotu(II). Zmiany są zależne od stężenia fluorku i czasu trwania hodowli.

Wnioski. Długotrwała ekspozycja nawet na niskie stężenia fluoru zaburza homeostazę komórek.

Słowa kluczowe: fluor, adenosynotrifosforan (ATP), tlenek azotu, wskaźnik wzrostu hodowli

SUMMARY

Introduction. The fluorine content in food depends on the presence of its compounds in water, soil and air. Owing to the high activity of the fluoride ion and its significant affinity to divalent metals, which are co-factors of many enzymes, changes in the activity of these enzymes may take place, resulting, among other things, in ATP concentration changes and free radical generation. The aim of this work was to assess the effects of length of exposure and fluorine concentration on culture growth, fibroblast energy homeostasis and the production of nitric oxide.

Material and methods. The research was conducted on fibroblasts isolated by means of mouse skin tissue explants from the tail and abdomen, BALB/c strain. The culture was bred with added sodium fluoride of final concentration of: 0.03 mmol/l; 0.06 mmol/l and 0.12 mmol/l. The culture growth time was: 1, 3 and 6 days. The culture growth indicator (N/N_0) was determined, as well as the ATP concentration and the amount of nitric oxide(II) released into the medium. The results obtained were calculated for 1×10^6 cells.

Results. The highest values of the growth indicator, ATP concentration and nitric oxide were found in control cultures. The results obtained suggest that the presence of fluoride ions inhibits fibroblast culture growth, decreases ATP synthesis and lowers nitric oxide(II) production. The changes depend on the concentration of fluoride and the time of cell culture cultivation.

Conclusions. Long-term exposure even to low fluoride concentrations disturbs cell homeostasis.

Key words: fluoride, adenosine triphosphate (ATP), nitric oxide, values of cell growth

WSTĘP

Fluor należy do substancji, których toksyczność poddawana jest licznym badaniom, ponieważ różnica pomiędzy dawką toksyczną a terapeutyczną jest niewielka [1]. Fluor jest wszechobecny, gdyż stanowi zanieczyszczenie środowiskowe, a także występuje w pożywieniu, wodach wysoko mineralizowanych i preparatach stomatologicznych; jest również składnikiem leków. W pastach do mycia zębów i płynach do płukania jamy ustnej zawartość fluoru wynosi od 1000 do 15 000 ppm [2]. Normy spożycia fluoru zostały ustalone na poziomie wystarczającego spożycia (AI – *Adequate Intake*) dla wszystkich grup ludności. Zgodnie z obowiązującymi normami dla populacji polskiej AI na dobę dla fluoru wynosi: 3 mg dla kobiet i 4 mg dla mężczyzn od 19 r.ż., oraz nie przekracza 2 mg dla dzieci do 12 r.ż. [3]. Spośród produktów spożywczych dobrym źródłem fluoru są: herbata, produkty zbożowe, sery podpuszczkowe i ryby morskie. Zawartość fluoru w żywności zależy od obecności jego związków w wodzie, glebie i powietrzu [4]. I tak zawartość fluoru w herbacie jest bardzo różna, zależna od miejsca uprawy, gatunku herbaty oraz sposobu jej parzenia [5]. W niektórych regionach Indii i Chin, gdzie uprawiany jest krzew herbaciany obserwuje się naturalną wysoką zawartość fluorków w wodach podziemnych i gruntowych [6]. Fluor niewątpliwie pełni istotną rolę w profilaktyce próchnicy zębów lecz z uwagi na wąski margines bezpieczeństwa powinien być stosowany z rozważeniem, gdyż jego nadmiar skutkuje wystąpieniem fluorozę kości i zębów. Wiele badań potwierdziło udział fluoru w procesach wolnorodnikowych [7]. Z uwagi na dużą aktywność jonu fluorkowego i znaczne powinowactwo do metali dwuwartościowych, które są kofaktorami wielu enzymów, możliwa jest zmiana aktywności tych enzymów skutkująca m.in. zmianami stężenia ATP oraz powstawaniem wolnych rodników. Celem pracy było przeprowadzenie badań polegających na ocenie wpływu jonów fluorkowych w stężeniach nie przekraczających wartości uznanych za szkodliwe dla zdrowia, na wzrost hodowli fibroblastów, ich stan metaboliczny oraz zdolność do wytwarzania tlenu azotu.

MATERIAŁ I METODY

Badania prowadzono na fibroblastach izolowanych metodą eksplantów tkanki ze skóry pobranej z ogona i brzucha myszy, szczepu BALB/c. Zwierzęta pochodziły z hodowli prowadzonej przez Centrum Medycyny Doświadczalnej Śląskiego Uniwersytetu

Medycznego (zgoda Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach SUM). Fibroblasty hodowano w pożywce Dulbecco'a DMEM z dodatkiem fluorku sodu o stężeniu końcowym: 0,03 mmol/l; 0,06 mmol/l i 0,12 mmol/l. Stężenia zostały dobrane tak, aby nie powodować wytrącenia trudno rozpuszczalnych fluorków wapnia i magnezu, oraz aby obserwowane zmiany wynikały jedynie z obecności jonów fluorkowych. Hodowle fibroblastów kontrolnych zawieszono w samej pożywce. Hodowle prowadzono przez 1, 3 i 6 dni, w inkubatorze firmy Heraeus, w temp. 37°C, atmosferze zawierającej 5% CO₂. Komórki wybarwiano 0,4% błękitem trypanu [8], zliczano przy pomocy licznika komórek Countess™ firmy Invitrogen. Wskaźnik wzrostu hodowli (N/N₀) wyznaczono jako iloraz liczby fibroblastów w 1 ml pożywki w dniu zakończenia (N) i w dniu założenia (N₀) hodowli. Stężenie ATP oznaczano w komórkach przy pomocy zestawu testów firmy Perkin-Elmer. Zasada oznaczenia polega na reakcji ATP z D-lucyferyną w obecności lucyferazy, której towarzyszy emisja światła [9]. Wytwarzanie tlenu azotu(II) oznaczano poprzez spektrofotometryczny pomiar azotanów(III), powstałych z NO i uwolnionych do medium hodowlanego. Oznaczenie wykonano z zastosowaniem odczynnika Griessa. Uzyskane wyniki przeliczano na 1x10⁶ komórek i poddano opracowaniu statystycznemu. Obliczono wartości podstawowych parametrów opisowych: średnią arytmetyczną i odchylenie standardowe. Wartości tych parametrów przedstawiono w tabelach. Następnie przy pomocy programu komputerowego STATISTICA 10.0 sprawdzono normalność uzyskanych wyników testem Shapiro-Wilka. Wyniki dotyczące grup kontrolnych i badanych porównano testem t-Studenta dla prób zależnych.

WYNIKI

Liczba komórek martwych wybarwiających się błękitem trypanu w żadnej z badanych hodowli fibroblastów nie przekroczyła 10%.

Obliczone wartości wskaźnika wzrostu komórek (N/N₀) przedstawiono w tabeli I. Jego wartość była odwrotnie proporcjonalna do stężenia NaF w pożywce; największe wartości stwierdzono w hodowlach kontrolnych. Po 1 i 3 dobie hodowli dla stężenia F1 stwierdzono nieistotny statystycznie (p>0,05) spadek wartości wskaźnika wzrostu odpowiednio o 3,6% i 10,9% w porównaniu do grupy kontrolnej. W 6 dniu hodowli zmiana wskaźnika wzrostu dla tego stężenia wynosiła 11,1%, przy p<0,05. Dla

stężenia F2 wskaźnik wzrostu hodowli zmniejszał się od 14,2% do 18,4% w odniesieniu do grupy kontrolnej i we wszystkich przypadkach zmiany te były istotne statystycznie ($p < 0,05$). Podobną zależność stwierdzono dla najwyższego stężenia F3, dla którego spadek wartości wskaźnika wzrostu był jeszcze bardziej nasilony i wynosił od 18,6% do 36,2%, przy $p < 0,05$.

Tabela I. Wartości wskaźnika wzrostu komórek (N/N_0) w hodowlach fibroblastów z NaF i hodowli kontrolnej

Table I. Cell growth index (N/N_0) in fibroblast cultures with NaF and the control culture

| Czas hodowli | 1 doba | 3 doba | 6 doba |
|--------------|------------|------------|------------|
| K | 1,37±0,10 | 1,83±0,12 | 4,50±0,11 |
| F1 | 1,32±0,12 | 1,63±0,13 | 4,00±0,14* |
| F2 | 1,17±0,11* | 1,57±0,10* | 3,67±0,15* |
| F3 | 1,03±0,13* | 1,49±0,11* | 2,87±0,13* |

K – hodowla kontrolna (*control culture*)

F1, F2, F3 – hodowle z dodatkiem NaF [F1 = 0,03 mmol/l;

F2 = 0,06 mmol/l; F3 = 0,12 mmol/l] (*cultures with NaF*

[F1 = 0,03 mmol/l; F2 = 0,06 mmol/l; F3 = 0,12 mmol/l])

* $p < 0,05$ względem kontroli ($p < 0,05$ against the control)

W tabeli II zostały przedstawione średnie wartości stężenia ATP oznaczone w badanych hodowlach z dodatkiem NaF oraz hodowli kontrolnej. Dodatek jonów fluorkowych we wszystkich analizowanych układach spowodował obniżenie stężenia ATP. Dla najniższego stężenia F1, w 1 i 3 dniu hodowli zmiany wynosiły od 5,7% do 6,4% i nie były istotne statystycznie ($p > 0,05$). Natomiast w 6 dniu trwania hodowli stężenie ATP, zmalało w odniesieniu do kontroli o 7,4% ($p < 0,05$). Istotny statystycznie ($p < 0,05$) spadek stężenia ATP stwierdzono również w hodowlach o wyższym stężeniu fluoru (F2 i F3). W hodowlach tych stężenie malało odpowiednio: 8,7% i 9,9% po 1 dobie, 9,6% i 16,7% po 3 dobie oraz 11,9% i 18,7% w 6 dobie, przy $p < 0,05$.

Tabela II. Stężenie ATP [$\mu\text{mol}/10^6$ komórek] w hodowlach fibroblastów z NaF i hodowli kontrolnej

Table II. ATP concentration [$\mu\text{mol}/10^6$ cells] in fibroblast cultures with NaF and the control culture

| Czas hodowli | 1 doba | 3 doba | 6 doba |
|--------------|------------|------------|------------|
| K | 3,34±0,11 | 4,36±0,16 | 9,89±0,09 |
| F1 | 3,15±0,13 | 4,08±0,14 | 9,16±0,10* |
| F2 | 3,05±0,10* | 3,94±0,12* | 8,71±0,12* |
| F3 | 3,01±0,08* | 3,63±0,13* | 8,04±0,11* |

K – hodowla kontrolna (*control culture*)

F1, F2, F3 – hodowle z dodatkiem NaF [F1 = 0,03 mmol/l;

F2 = 0,06 mmol/l; F3 = 0,12 mmol/l] (*cultures with NaF*

[F1 = 0,03 mmol/l; F2 = 0,06 mmol/l; F3 = 0,12 mmol/l])

* $p < 0,05$ względem kontroli ($p < 0,05$ against the control)

W tabeli III przedstawiono średnie stężenia azotanów(III) oznaczone w medium fibroblastów prowadzonych z dodatkiem NaF i w hodowlach kontrolnych. Obecność NaF, bez względu na zastosowane stężenie, spowodowała istotne statystycznie zmniejszenie wytwarzania NO. Zmiany te były proporcjonalne do wzrostu stężenia jonów F^- w medium hodowlanym. W 1 dniu hodowli zmiany stężenia tlenu azotu w odniesieniu do hodowli kontrolnej, były najmniejsze i wynosiły: 4,2%, 5,8% i 14,2%, odpowiednio dla: F1, F2 i F3 ($p < 0,05$). W 3 dniu hodowli zmiany wynosiły od 4,5% dla najniższego stężenia fluorku (F1) do 15,4% dla stężenia najwyższego (F3), przy $p < 0,05$. Największe zmiany stwierdzono w 6 dobie trwania hodowli: 10,1% dla F1, 14,0% dla F2 i 23,6% dla F3 ($p < 0,05$).

Tabela III. Stężenie azotanów (III) [$\mu\text{mol}/10^6$ komórek] w hodowlach fibroblastów z NaF i hodowli kontrolnej

Table III. Nitrate (III) concentration [$\mu\text{mol}/10^6$ cells] in fibroblast cultures with NaF and the control culture

| Czas hodowli | 1 doba | 3 doba | 6 doba |
|--------------|-------------|-------------|------------|
| K | 11,03±0,17 | 10,61±0,22 | 10,44±0,21 |
| F1 | 10,57±0,16* | 10,13±0,20* | 9,36±0,18* |
| F2 | 10,39±0,18* | 9,89±0,19* | 8,98±0,16* |
| F3 | 9,46±0,15* | 8,98±0,18* | 7,95±0,15* |

K – hodowla kontrolna (*control culture*)

F1, F2, F3 – hodowle z dodatkiem NaF [F1 = 0,03 mmol/l;

F2 = 0,06 mmol/l; F3 = 0,12 mmol/l] (*cultures with NaF*

[F1 = 0,03 mmol/l; F2 = 0,06 mmol/l; F3 = 0,12 mmol/l])

* $p < 0,05$ względem kontroli ($p < 0,05$ against the control)

DYSKUSJA

Badania toksykologiczne często prowadzi się w oparciu o modele *in vivo* lub *in vitro*. W pracach badawczych dotyczących oddziaływania jonów fluorkowych *in vitro* najczęściej wykorzystywano hodowle komórek tkanki łącznej, takie jak: osteoblasty, odontoblasty i fibroblasty [10, 11]. Wybór fibroblastów jako modelu badawczego wynika z łatwości ich izolacji, możliwości pozyskania dużej liczby komórek, a ponadto hodowle te charakteryzuje duża jednorodność, co korzystnie wpływa na powtarzalność wyników.

Istotnym problemem związanym z badaniami dotyczącymi oddziaływania jonów fluorkowych *in vitro* jest możliwość powstawania trudno rozpuszczalnych fluorków wapnia i magnezu oraz tworzenia jonów kompleksowych z metalami dwu- i trójwartościowymi (Al^{+3} , Fe^{+3} , Ca^{+2} , Mg^{+2}). Fakt ten umożliwia przyłączenie jonów F^- do centrów aktywnych enzymów, zawierających te metale lub stwarza możliwość kompleksowania przez jony fluorkowe kationów metali obecnych w cytoplazmie komórki [12]. Z uwagi na bardzo niską wartość iloczynu rozpuszczalności dla CaF_2 i MgF_2 , aby uniknąć konsekwencji niedoboru wapnia i magnezu w pożywce hodowlanej, w przeprowadzonym eksperymencie zastosowano takie stężenia jonów fluorkowych (po uwzględnieniu stężenia jonów wapnia i magnezu obecnych w pożywce), aby uzyskane wyniki umożliwiły ocenę oddziaływania jonów fluorkowych w warunkach niezmienionego stężenia jonów wapnia i magnezu. Zastosowane w pracy stężenia fluorków nie powodowały wyższej niż w hodowlach kontrolnych śmiertelności komórek.

Jony fluorkowe wpływają na aktywność wielu enzymów związanych z procesami tworzenia energii m.in. enzymów biorących udział w metabolizmie węglowodanów oraz cyklu Krebsa [13].

W badaniach prowadzonych *in vitro*, uzyskane wyniki zależą od wielu czynników, m.in. od typu komórek przeznaczonych do badań, zastosowanego stężenia jonów fluorkowych oraz czasu trwania eksperymentu. Dogan i wsp. [14] wykazali brak efektów cytotoksycznych w odniesieniu do wszystkich rodzajów badanych komórek i przy stężeniu fluoru niższym niż 0,31 mmol/l. W badaniach na ludzkich fibroblastach Jeng i wsp. [15] wykazali, że stężenie F^- mniejsze od 2 mmol/l nie było toksyczne dla badanych komórek, natomiast wydłużenie czasu inkubacji, powodowało obniżenie stężenia ATP w komórkach i spadek syntezy białka. W przytoczonych pracach nie rozpatrywano jednak aspektu zmian stężeń jonów wapnia czy magnezu spowodowanych dodatkiem jonów fluorkowych w wysokich stężeniach.

W przeprowadzonych przez nas badaniach zastosowano niskie stężenia fluoru (0,57 mg/l i 1,14 mg/l), które nie przekraczają wartości 1,5 mg F^- /l, uznanej za najwyższe dopuszczalne stężenie fluoru w wodzie przeznaczonej do spożycia lub celów gospodarczych [16]. Trzecie wybrane stężenie wynoszące 2,28 mg F^- /l jest wyższe od tej wartości, ale nie przekracza 5 mg/l, tj. wartości, której przekroczenie może stanowić zagrożenie dla zdrowia publicznego [17]. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, iż dodatek do pożywki fluorku sodu

osłabia wzrost komórek. Zmiany dotyczą głównie dwóch wyższych stężeń F^- . Jednak przy najdłuższym czasie inkubacji, również najmniejsze stężenie fluoru powoduje osłabienie wzrostu fibroblastów. Istnieją doniesienia mówiące o hamującym wpływie fluorków na wzrost i żywotność komórek. Jony fluorkowe powodują również uszkodzenie materiału genetycznego, indukują stres oksydacyjny i aktywują mediatory apoptozy prowadząc do samobójczej śmierci komórki [18]. Zaobserwowany w naszych badaniach spadek syntezy ATP jest zależny od stężenia i czasu prowadzenia hodowli. Nawet najniższe stężenie fluorków, przy najdłuższym czasie inkubacji obniża syntezę ATP. Podobne wyniki uzyskali Gutowska i wsp. [19] badając ludzkie monocyty TH1. Tlenek azotu, będąc cząsteczką sygnałową pełni rolę w wielu procesach, zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych. Wyniki badań przeprowadzonych *in vivo* wskazują na wzrost stężenia NO w narządach szczurów, po podaniu im dużych dawek fluorku sodu (np. 10,3 mg NaF/kg m.c., 20 mg NaF/kg m.c., 25 mg F^- /l) przez okres 4 lub 5 tygodni [20–22]. Uzyskane przez nas wyniki wykazały zmniejszenie uwalniania NO przez fibroblasty, w miarę wzrostu stężenia F^- w pożywce i wydłużeniem czasu inkubacji do 6 dni. Mechanizm oddziaływania jonów fluorkowych na wytwarzanie NO nie jest znany, a obserwowane obniżenie uwalniania tlenu azotu przypuszczalnie związane jest z inhibicją syntazy tlenu azotu (NOS) przez jony F^- .

WNIOSKI

Uzyskane wyniki wskazują, że obecność jonów fluorkowych w stężeniach nie przekraczających wartości stanowiących zagrożenie dla zdrowia powoduje inhibicję wzrostu hodowli, obniżenie syntezy ATP oraz zmniejszenie wytwarzania tlenu azotu(II) w badanych hodowlach fibroblastów. Zmiany te są istotnie zależne od stężenia jonów fluorkowych i czasu trwania hodowli. Długotrwała ekspozycja na fluor, nawet przy najniższych jego stężeniach zmienia homeostazę komórek.

Źródło finansowania: praca została sfinansowana ze środków przeznaczonych na działalność statutową Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

PIŚMIENNICTWO

1. Gazzano E., Bergandi L., Riganti C. i wsp.: Fluoride effects: the two faces of janus. *Curr Med Chem* 2010; 17(22): 2431-2441.

2. Tenuta L.M., Cury J.A.: Fluoride: its role in dentistry. *Braz Oral Res* 2010; (24): 9-17.
3. Jarosz M. (red): Normy Żywienia dla populacji polskiej – nowelizacja. IŻŻ Warszawa 2012: 140.
4. Dhar V., Bhatnagar M.: Physiology and toxicity fluoride. *Indian J Dent Res* 2009; 20: 350-355.
5. Malinowska E., Inkielewicz I., Czarnowski W. i wsp.: Assessment of fluoride concentration and daily intake by human from tea and herbal infusions. *Food Chem Toxicol* 2008; (46): 1055-1061.
6. Wen D., Zhang F., Zhang E. i wsp.: Arsenic, fluoride and iodine in groundwater of China. *Journal of Geochemical Exploration* 2013; (135): 1-21.
7. Reddy G.B.: Fluoride toxicity and oxidative stress. *Fluoride* 2004; 37: 43-44.
8. Philips D.J.: Dye exclusion test for cell viability, in: tissue, culture, methods and application. *Acad Press* 1978; 406-408.
9. Kangas L., Gronroos M., Nieminen A.L.: Bioluminescence of cellular ATP: a new method for evaluating cytotoxic agents in vitro. *Med Biol* 1984; 62: 338-343.
10. Duan X., Xu H., Wang Y., Wang H., Li G., Jing L.: Expression of core-binding factor 1 and osteocalcin in fluoride-treated fibroblasts and osteoblasts. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2014; 28: 278-283.
11. Hye-Jin L., Choong-Ho C.: Anti-inflammatory effects of bamboo salt and sodium fluoride in human gingival fibroblasts – An in vitro study. *Kaohsiung J Med Sci* 2015; 31: 303-308.
12. Machoy Z.: Wpływ związków fluoru na łańcuch oddechowy. *Bromat Chem Toksykol* 1981; 24: 101-106.
13. Adamek E., Pawłowska-Góral K., Bober K.: Wpływ jonów fluorkowych na aktywność enzymów w badaniach *in vitro* i *in vivo*. *Ann Acad Med Stetin* 2005; 51: 69-85.
14. Dogan S., Gunay H., Leyhausen G., Geurtsen W.: Chemical-biological interactions of NaF with three different cell lines and caries pathogen *Streptococcus sobrinus*. *Clin Oral Invest* 2002; 6: 92-97.
15. Jeng J.H., Heiseh C.C., Lan M.C., Chang S.k., Lin S.J., Hahn L.J., Kuo M.Y.: Cytotoxicity od sodium fluoride on human oral mucosal fibroblasts and its mechanisms. *Cell Biol Toxicol* 1998; 14: 383-289.
16. Jędra M., Urbanek-Karłowska B., Gawarska H., Sawilska-Rautenstrauch D.: Zawartość fluoru w napojach bezalkoholowych produkowanych w Polsce. *Roczn. PZH* 2006; 57: 203-210.
17. Commission Directive 2003/40/EC of 16 May 2003 establishing the list, concentration limits and labeling requirements for the constituents of natural mineral waters and the conditions for using ozone-enriched air for the treatment of natural mineral waters and the conditions for using ozone-enriched air for the treatment of natural mineral waters and spring waters. *Off J European Union L 126/34*, 22.05.2003
18. Lee J.H., Jung J.Y., Jeong Y.J., i wsp.: Involvement of both mitochondrial- and death receptor-dependent apoptotic pathways regulated by Bcl-2 family in sodium fluoride-induced apoptosis of the human gingival fibroblasts. *Toxicology* 2008; 243(3): 340-347.
19. Gutowska I., Baranowska-Bosiacka I., Baskiewicz M. i wsp.: Fluoride as a pro-inflammatory factor and inhibitor of ATP bioavailability in differentiated human TH1 monocytic cells. *Toxicol Lett* 2010; 196: 74-79.
20. Hassan H.A., Abdel-Aziz A.F.: Evaluation of free radical-scavenging and anti-oxidant properties of black berry against fluoride toxicity in rats. *Food Chem Toxicol* 2010; 48: 1999-2004.
21. Inkielewicz-Stepniak I., Czarnowski W.: Oxidative stress parameters in rats exposed to fluoride and caffeine. *Food Chem Toxicol* 2010; 48: 1607-1611.
22. Pal S., Sarkar Ch.: Protective effect of resveratrol on fluoride induced alteration in protein and nucleic acid metabolism, DNA damage and biogenic amines in rat brain. *Environ Toxicol Pharmacol* 2014; 38: 684-699.

Adres do korespondencji:

dr Ewa Kurzeja
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny
Laboratoryjnej w Sosnowcu,
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach,
Katedra i Zakład Żywności i Żywienia
41-200 Sosnowiec, ul. Jedności 8
tel. 32 364 11 70
e-mail: ekurzeja@sum.edu.pl