

ANGELIKA DOMINIKOWSKA, ROBERT KUBINA, ANNA KLECZKA, MAGDALENA WYSZYŃSKA, AGATA KABAŁA-DZIK

Ocena wpływu resweratrolu oraz kwasu α -liponowego na cytotoksyczność jonów fluorkowych w stosunku do ludzkich fibroblastów płucnych IMR-90

The effect of resveratrol and α -lipoic acid on the cytotoxicity of fluoride ions to human lung fibroblasts IMR-90

Katedra i Zakład Patologii, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

KEYWORDS

human lung fibroblasts IMR-90, NaF, resveratrol and α -lipoic acid, cell culture, cytotoxicity

SUMMARY

Introduction. Fluorine belongs to xenobiotics that cause disorders in the oxidative-reducing system. Recent studies with fluoride concern the use of natural products containing vitamins or antioxidant to prevent the oxidative stress generated by exposure to fluoride.

Aim. The aim of the research was to evaluate the impact of resveratrol and α -lipoic acid on the cytotoxicity of fluoride relative to human lung fibroblasts IMR-90.

Material and methods. In order to determine cytotoxicity of fluorine on human lung fibroblasts IMR-90, the cells were cultured with different NaF concentrations: 30, 60, 90, 120 and 150 $\mu\text{g/ml}$. Cytotoxicity of the examined cells was also determined in cultures incubated with the resveratrol (RV) and α -lipoic acid (LA) in various combination of concentration: RV 3 μM and LA 25 $\mu\text{g/ml}$; RV 10 μM and LA 25 $\mu\text{g/ml}$. MTT test was used to evaluate the viability of the cells. The cytotoxicity assessment was carried out in three time intervals: after 24, 48 and 72 h.

Results. It has been observed that NaF is cytotoxic in relation to the examined cell line, depending on its concentration and exposure time of cells. No significant changes have been observed in relation to the viability of the examined cells in cultures with combinations of different concentrations of the examined antioxidants. Preincubation of fibroblasts with RV and LA positively affected viability of cells cultured with NaF. The beneficial effect of the tested compounds was dependent on its concentrations, level of NaF and exposure time.

Conclusions. The results indicate that a diet containing α -lipoic acid and resveratrol can play a protective role in exposed to fluoride.

WPROWADZENIE

Wiedza zarówno na temat korzystnego, jak i negatywnego działania fluoru jest bardzo duża. Wielu naukowców udowodniło, że jest on niezbędnym pierwiastkiem biorącym udział w prawidłowym rozwoju kości i zębów. Niestety, jest też „druga twarz” fluoru – ta negatywna. Ujawnia się ona w przypadku masowego narażenia na duże stężenie fluoru w wodzie pitnej czy żywności, co prowadzi nie tylko do fluorozu, ale także do zaburzenia czynności wielu narządów, w tym neurologicznych.

Fluor jest najłżejszym pierwiastkiem wśród fluorowców. To żółtozielony gaz o mocnym zapachu, który przypomina kwas chlorowy (I) (1). Jest pierwiastkiem bardzo

reaktywnym (2) i w przyrodzie nigdy nie występuje w stanie wolnym. Można go jedynie spotkać w postaci związków z innymi pierwiastkami. Fluor został opisany jako istotny składnik odżywczy organizmu, jak również należy do listy 14 elementów uznanych za niezbędne dla prawidłowego wzrostu i rozwoju człowieka (3). Jest on podstawowym komponentem budulcowym kości i zębów, w których występuje 99% jego ilości znajdującej się w organizmie. Instytut Medycyny Amerykańskiej Akademii Nauk opracował zalecane normy żywieniowe dla spożycia fluoru (4). Narażenie na fluor może występować w miejscach endemicznego występowania fluoru, w zakładach przemysłowych i ich otoczeniu, jak również ze strony pożywienia.

Endemiczna fluoroza jest chorobą występującą na całym świecie, spowodowaną głównie spożyciem nadmiernej ilości fluoru w trzech formach: z wodą i herbatą o zwiększonej zawartości fluoru oraz pieczoną żywnością, zanieczyszczoną fluorem pochodzącym z węgla, na którym była przygotowywana.

Fluor może prowadzić do zakłócenia funkcji mózgu, obniża IQ, pobudza wytwarzanie wolnych rodników, a co za tym idzie zwiększa ryzyko rozwoju choroby Alzheimera. Upośledza funkcjonowanie układu hormonalnego. Wpływa również na szyszynkę, co objawia się zmianami w produkcji melatoniny oraz w dojrzewaniu płciowym (przyspiesza pojawienie się pierwszej miesiączki). Przypuszcza się także, że fluor może inicjować procesy nowotworzenia, szczególnie w kościach. Przykładem takiego nowotworu jest kostniakomięsak, spowodowany działaniem mutagennym fluoru na komórki kostne. Kolejnym nowotworem, który może być zapoczątkowywany ekspozycją na fluor w miejscach pracy, jest rak pęcherza moczowego (5). Fluor powoduje zmiany hematologiczne: niedokrwistość, zmiany w kształcie i wielkości erytrocytów, obecność ciałek Heinza w erytrocytach, eozynofilię i limfopenię, zwiększenie ilości methemoglobiny oraz zmiany wartości hematokrytu (6). Fluor powoduje także zmiany w układzie krążenia, które objawiają się zmniejszeniem sprężystości aorty oraz rozwojem nadciśnienia tętniczego (7). Fluor wykazuje toksyczne działanie w badaniach przeprowadzonych na hodowlach komórkowych. W ludzkich fibroblastach działaniem wywołanym przez fluor zależą od dawki i czasu ekspozycji na jego związki. Fluor powoduje zmniejszenie potencjału błonowego mitochondriów, trudności w syntezie DNA oraz wyczerpanie komórkowego GSH (8).

Kwas α -liponowy jest antyoksydantem pełniącym wiele funkcji. Wykazuje aktywność przeciwzapalną, a także jest pomocny w zaburzeniach mitochondrialnych. Jest kofaktorem enzymów, w tym kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej oraz kompleksu dehydrogenazy α -ketoglutaranu. Są to dwa mitochondrialne enzymy uczestniczące w metabolizmie glukozy i produkcji energii (9). LA jest również zdolny do zmiatania ROS, w tym rodnika hydroksylowego i tlenu singletowego. Bezpośrednio reaguje z nadtlenoazotynem – wysoce reaktywnym oksydantem, uważanym za głównego sprawcę wszystkich cytotoksycznych działań tlenu azotu. Zmniejszenie stresu oksydacyjnego za pośrednictwem LA odbywa się również poprzez odtwarzanie innych przeciwutleniaczy, a także hamowanie peroksydacji lipidów. LA oprócz zdolności do bezpośredniego zmiatania ROS wywiera działanie przeciwutleniające poprzez chelatowanie metali przejściowych, głównie dwuwartościowych. Tworzy trwałe związki z dwuwartościowymi jonami metali, takimi jak: mangan, miedź, żelazo i cynk (10). Endogeny selen organiczny nie działa bezpośrednio na wolne rodniki, ale pośrednio pełni rolę kofaktora GPX, a tym samym uczestniczy w reakcji redukcji H_2O_2 i ponadtlenku.

Resweratrol będący przedstawicielem przeciwutleniaczy fenolowych występuje w największych ilościach w czerwonych winogronach. Wykazuje działanie antyoksydacyjne,

przeciwnowotworowe i przeciwzapalne. Chroni przed powstawaniem nadtlenków lipoprotein o niskiej gęstości i liposomów, jest silnym inhibitorem lipooksygenazy. Jego właściwości antyoksydacyjne są związane z obecnością grup hydroksylowych w jego cząsteczce (11). RV jest w stanie zwiększyć aktywność enzymów antyoksydacyjnych układu odpornościowego: SOD, CAT i GPX. Ponadto zarówno w warunkach normalnych, jak i stresu oksydacyjnego zwiększa poziom zredukowanego GSH. RV hamuje produkcję ROS poprzez ich bezpośrednie wychwytywanie, czyli zjawisko zmiatania (12).

CEL PRACY

Celem pracy była ocena wpływu resweratrolu oraz kwasu α -liponowego na żywotność ludzkich fibroblastów płucnych linii IMR-90 hodowanych w obecności różnych stężeń jonów fluorkowych wywołujących działanie cytotoksyczne na badane komórki.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiła linia komórkowa ludzkich fibroblastów płucnych IMR-90. W doświadczeniu użyto fluorku sodu (NaF) firmy Avantor Performance Materials Poland SA oraz antyoksydantów: kwasu α -liponowego (LA) firmy Sigma-Aldrich oraz resweratrolu (RV) firmy Sigma-Aldrich. Badania *in vitro* prowadzono w butelkach hodowlanych o powierzchni 75 cm², w określonym środowisku składającym się z podłoża Eagle'a (MEM) zawierającego dodatkowo: 2 mM L-glutaminy, 4,5 g/l glukozy, 1 mM pirogronianu sodowego, 10% inaktywowanej termicznie płodowej surowicy bydlęcej (FBS), 1% roztwór niezbędnych aminokwasów (MEM Non-essential Amino Acid Solution) oraz antybiotyki: 100 IU/ml penicyliny, 100 μ g/ml streptomycyny oraz 0,25 μ g/ml amfoterycyny B. Komórki hodowano w inkubatorze z dopływem CO₂ w temperaturze 37°C oraz atmosferze nasyconej parą wodną z dodatkiem 5% CO₂.

W celu oceny cytotoksyczności fluoru badano żywotność komórek w obecności różnych stężeń NaF w podłożach: 30, 60, 90, 120 i 150 μ g/ml. Podobną hodowlę przeprowadzono w obecności różnych kombinacji stężeń LA i RV: RV 3 μ M i LA 25 μ g/ml; RV 10 μ M i LA 25 μ g/ml dodanych do podłoża łącznie z fluorkiem sodu w 4 wybranych stężeniach (30, 60, 90, 120 μ g/ml). Oznaczenie cytotoksyczności wykonano po 24, 48 i 72 godz. W celu określenia cytotoksyczności fluoru zastosowano test MTT firmy Sigma-Aldrich.

Analiza statystyczna

Do utworzenia bazy danych wykorzystano program Excel 2010 firmy Microsoft. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu Statistica 12.0 firmy StatSoft Polska. Podobieństwo rozkładu zmiennych do rozkładu normalnego sprawdzano testem Shapiro-Wilka. Do oceny istotności statystycznej uzyskanych wyników wykorzystano test t-Studenta oraz analizę wariancji ANOVĘ. Za istotne statystycznie zmiany uznano wartości $p < 0,05$.

Badania finansowane były z umowy nr KNW-1-025/N/5/0.

WYNIKI

Ocena aktywności cytotoksycznej fluoru w stosunku do fibroblastów płucnych linii IMR-90

Na rycinie 1 przedstawiono wpływ różnych stężeń NaF na żywotność ludzkich fibroblastów płucnych linii IMR-90 wyrażoną w (%) po 24, 48 i 72 godz. inkubacji komórek. Zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie żywotności fibroblastów płucnych w zależności od stężenia NaF i czasu inkubacji w stosunku do żywotności obserwowanej w grupie kontrolnej. Obniżenie znamienne statystycznie cytotoksyczności w stosunku do hodowli kontrolnej wykazano przy stężeniach NaF 60, 90, 120 i 150 $\mu\text{g/ml}$ w każdym analizowanym czasie.

W tabeli 1 przedstawiono wartości IC50 w zależności od czasu inkubacji, które wyrażają stężenie NaF ($\mu\text{g/ml}$) hamujące w 50% żywotność komórek. Uzyskane wartości IC50, wraz ze wzrostem czasu inkubacji ludzkich fibroblastów płucnych linii IMR-90 z NaF maleją.

Wpływ resweratrolu oraz kwasu α -liponowego na aktywność cytotoksyczną fluoru w badaniach *in vitro*

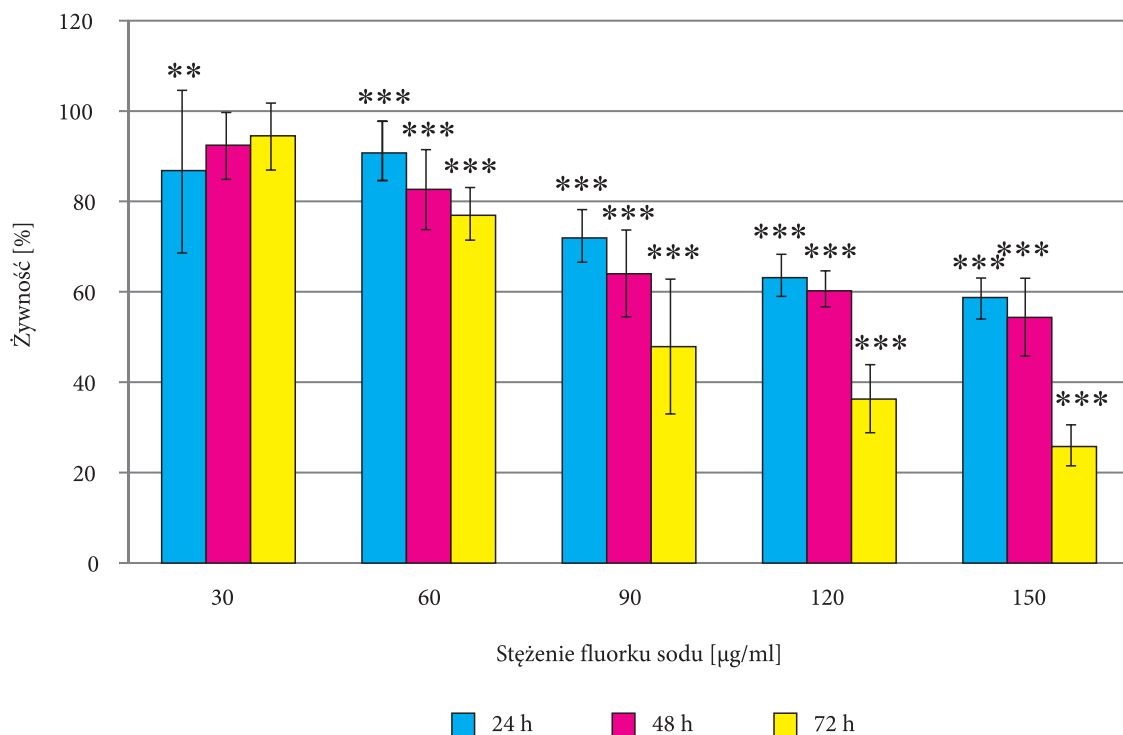
Na rycinie 2 zobrazowano wpływ 3 μM RV i 25 $\mu\text{g/ml}$ LA na cytotoksyczność wywołaną przez różne stężenia NaF. Podanie antyoksydantów spowodowało podwyższenie żywotności ludzkich fibroblastów płucnych po 24, 48 i 72 godz. w obecności 30 $\mu\text{g/ml}$ NaF.

Tab. 1. Stężenie NaF ($\mu\text{g/ml}$) hamujące w 50% żywotność ludzkich fibroblastów płucnych linii IMR-90 w zależności od czasu inkubacji (godz.)

Czas inkubacji (godz.)	Wartość IC50 NaF [$\mu\text{g/ml}$]
24	276,84
48	183,43
72	90,62

Najlepsze działanie ochronne antyoksydantów wykazano po 48 godz. inkubacji. Żywotność komórek zwiększyła się o 28,39% na poziomie istotności $p < 0,001$ w stosunku do ich żywotności obserwowanej po narażeniu na NaF. Natomiast po 24 i 72 godz. żywotność była nieco niższa i wzrosła odpowiednio o 15,05 i 18,57%.

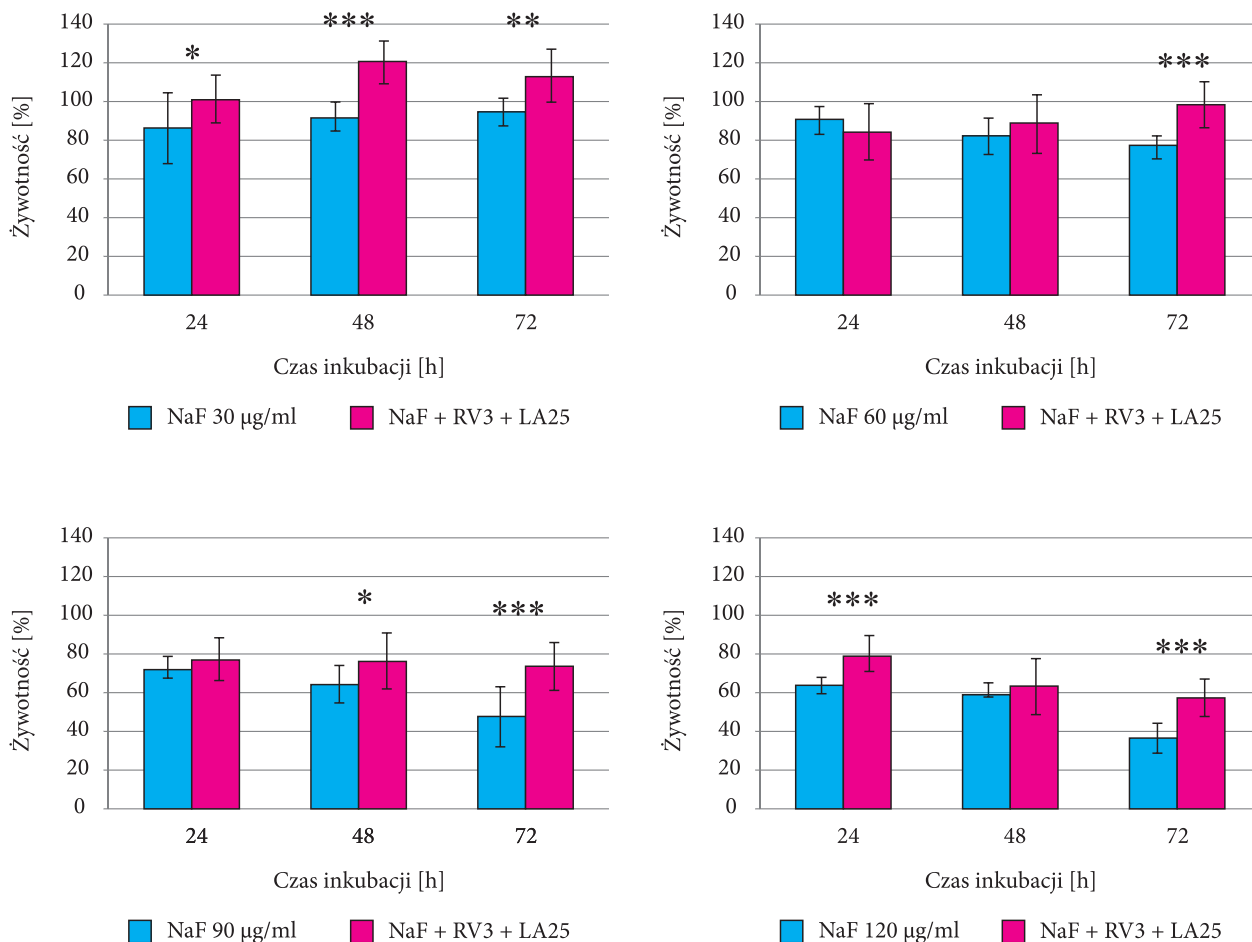
Preinkubacja komórek z antyoksydantami spowodowała znamienne statystycznie wzrost ich żywotności po 72 godz. w stosunku do hodowli komórek bez preinkubacji prowadzonych w obecności 60 $\mu\text{g/ml}$ NaF (o 11,15%). Po 24 i 48 godz. nie zaobserwowano korzystnego wpływu na żywotność komórek. W wyższych stężeniach NaF – 90 $\mu\text{g/ml}$ obserwowano istotne statystycznie podwyższenie żywotności po 48 i 72 godz. po preinkubacji komórek z RV i LA (o 12,01 i 25,21%). W hodowlach komórek narażonych na stężenie



Ryc. 1. Żywotność ludzkich fibroblastów płucnych linii IMR-90 wyrażona w (%) w hodowlach prowadzonych w obecności różnych stężeń NaF ($\mu\text{g/ml}$) po 24, 48 i 72 godz. inkubacji

** istotność statystyczna na poziomie $p < 0,01$

*** istotność statystyczna na poziomie $p < 0,001$



Ryc. 2. Wpływ antyoksydantów w stężeniach 3 µM RV i 25 µg/ml LA na żywotność ludzkich fibroblastów płucnych linii IMR-90 wyrażona w (%) w hodowlach narażonych na różne stężenia NaF po 24, 48 i 72 godz. inkubacji

- * istotność statystyczna na poziomie $p < 0,05$
- ** istotność statystyczna na poziomie $p < 0,01$
- *** istotność statystyczna na poziomie $p < 0,001$

120 µg/ml NaF korzystny wpływ antyoksydantów odnotowano po 24 i 72 godz. (15,67 i 20,64%) w stosunku do cytotoksyczności w hodowli prowadzonej bez preinkubacji z antyoksydantami.

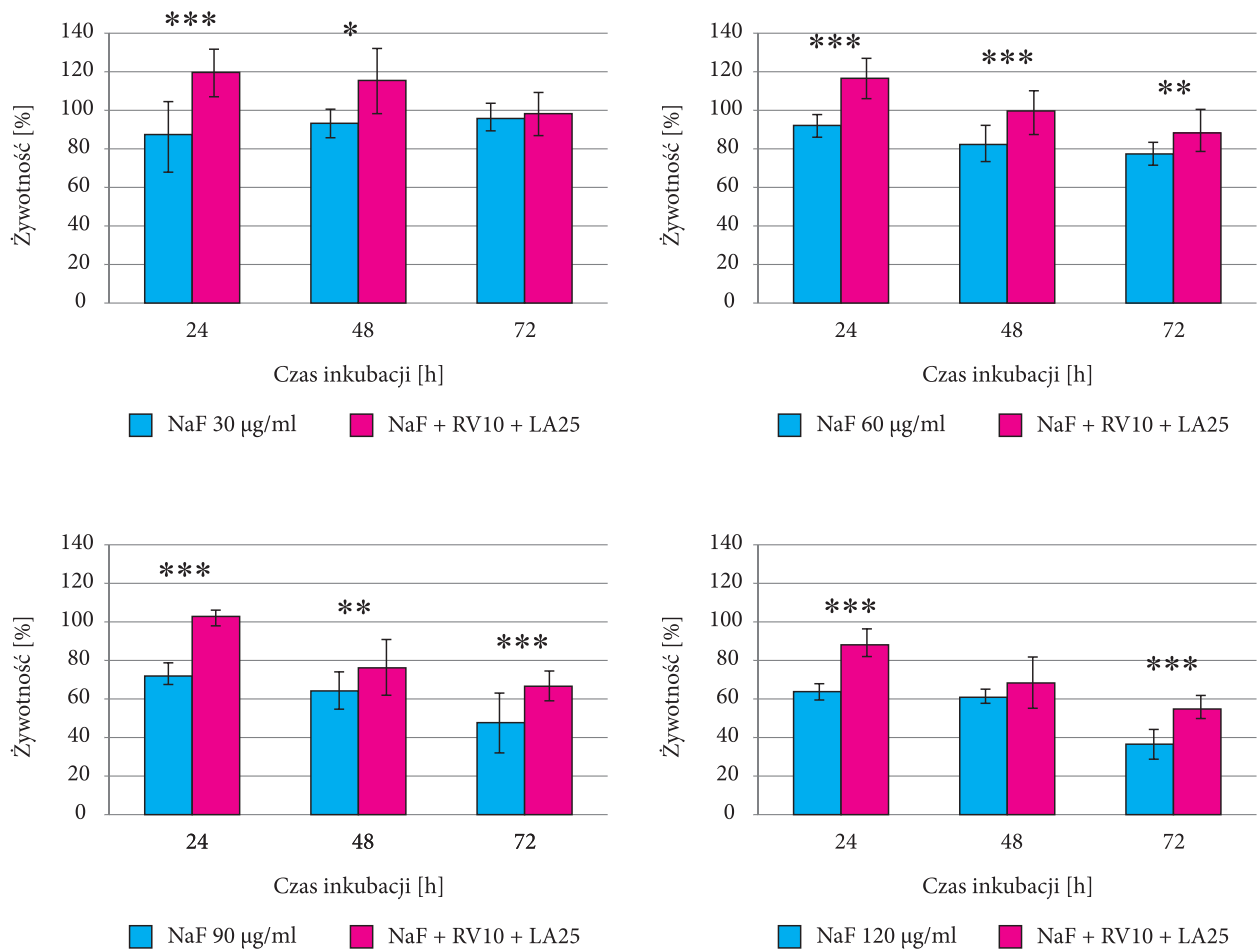
Wpływ łącznego podania 10 µM resweratrolu i 25 µg/ml kwasu α-liponowego na cytotoksyczność wywołaną przez różne stężenia fluoru w stosunku do ludzkich fibroblastów płucnych linii IMR-90

Rycina 3 ilustruje wpływ RV (10 µM) i LA (25 µg/ml) na cytotoksyczność powodowaną przez różne stężenia NaF. Preinkubacja komórek z powyższą kombinacją stężeń badanych antyoksydantów istotnie przeciwdziałała toksyczności NaF w stężeniach 30 µg/ml po 24 i 48 godz. Zaobserwowany wzrost żywotności wynosił odpowiednio 31,95 i 21,50%. Istotny statystycznie wzrost żywotności obserwowano także po 24, 48 i 72 godz. przy narażeniu na NaF w stężeniach 60 i 90 µg/ml. Ponadto po preinkubacji komórek z antyoksydantami zaobserwowano wzrost

żywotności komórek narażonych na stężenie NaF 120 µg/ml po 24 i 72 godz. Nie wykazano istotnego wpływu badanych antyoksydantów na komórki narażane w hodowlach na stężenie NaF 30 µg/ml po 72 godz. oraz na stężenie 120 µg/ml po 48 godz. Najwyższy wzrost żywotności komórek po preinkubacji z antyoksydantami w stosunku do żywotności komórek w hodowli bez wcześniejszej preinkubacji zaobserwowano po 24 godz. prowadzenia hodowli w obecności wszystkich stężeń NaF, na które były narażane ludzkie fibroblasty płucne linii IMR-90, i wynosił on odpowiednio dla stężenia NaF 30 µg/ml – 31,95%, dla stężenia NaF 60 µg/ml – 24,1%, dla stężenia NaF 90 µg/ml – 29,48%, dla stężenia NaF 120 µg/ml – 24,74%.

DYSKUSJA

Uzyskane wyniki badań wykazują korelację z wynikami otrzymanymi przez wielu naukowców, którzy badali żywotność fibroblastów narażonych na różne czynniki patogene (13-19). Wang i wsp. (13) w badaniach *in vitro*



Ryc. 3. Wpływ antyoksydantów w stężeniach 10 μ M RV i 25 μ g/ml LA na żywotność ludzkich fibroblastów płucnych linii IMR-90 wyrażona w (%) w hodowlach narażanych na różne stężenia NaF po 24, 48 i 72 godz. inkubacji

* istotność statystyczna na poziomie $p < 0,05$

** istotność statystyczna na poziomie $p < 0,01$

*** istotność statystyczna na poziomie $p < 0,001$

oceniali wpływ NaF i formaldehydu na cytotoksyczność zróżnicowanych fibroblastów ludzkich pochodzących z embrionalnych komórek macierzystych oraz fibroblastów pochodzących z mysiej tkanki łącznej. Do badania użyli NaF w stężeniach 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20 mmol/l, a cytotoksyczność wyznaczyli za pomocą testu MTT. Badacze wykazali wzrost cytotoksyczności NaF w odniesieniu do badanych komórek po 24 godz. inkubacji wraz ze wzrostem jego stężenia w podłożu. Przekraczała ona 80% przy najwyższym stężeniu NaF dla fibroblastów ludzkich. IC50 po 24-godzinnej inkubacji wyniosło 4,05 mmol/l dla komórek ludzkich i 3,82 mmol/l dla komórek mysich. Ponadto zaobserwowali, że podanie do medium hodowlanego NaF i formaldehydu spowodowało zatrzymanie komórek na różnych fazach cyklu komórkowego oraz uszkodzenia DNA.

Podobne badania przeprowadzili Inkielewicz-Stepniak i wsp. (16). Zbadali wpływ łącznego podania nanocząsteczek srebra i NaF na ludzkie fibroblasty dziąsłowe. Wykazali

oni, że żywotność komórek uległa zmniejszeniu w sposób zależny od stężenia NaF i nanocząsteczek srebra. Natomiast znacząco wzrosła po wprowadzeniu do podłoża obydwu związków razem. Do przeprowadzenia badania wykorzystano NaF w stężeniach: 0,5; 1 i 1,5 mmol/l. Cytotoksyczność oceniano po 24-godzinnej inkubacji za pomocą testu MTT. W badaniach wykazano podwyższenie ilości produktów peroksydacji lipidów (MDA) oraz obniżenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej. Fluor aktywował także szlaki MAPK i zwiększył ekspresję cytokin prozapalnych. Efekty te uległy nasileniu przy wspólnym zastosowaniu nanocząsteczek srebra z NaF.

Podobną zależność wykazali także Otsuki i wsp. (14). Zaobserwowali oni, że żywotność komórek ludzkiego raka płaskonabłonkowego i ludzkich fibroblastów dziąsłowych maleje wraz ze wzrostem stężenia NaF i czasu inkubacji. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem NaF w stężeniach 2,5-50 mmol/l. Odczyt absorbancji w teście MTT wykonali

po: 1, 2, 3, 4, 6 i 24 godz. Podobnie Jin-Ha i wsp. (17) dowiedli, że toksyczność NaF w stosunku do ludzkich fibroblastów dziąsłowych rośnie wraz ze wzrostem stężenia i czasu ekspozycji. Badania prowadzili przy narażeniu komórek na NaF w stężeniach 5-40 mM przez 12 godz. Cytotoksyczność uległa obniżeniu ze 100 do 11%. Wartość IC50 dla tego czasu to 20 mM NaF.

Prowadzono także badania związane z wpływem NaF na komórki tkanki kostnej. Slompo i wsp. (15) w badaniach *in vitro* stwierdzili wzrost żywotności preosteoblastów wraz ze wzrostem czasu inkubacji w hodowli kontrolnej (bez NaF). Natomiast w hodowlach prowadzonych w obecności różnych stężeń NaF: 5×10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} i 10^{-3} M) wykazano obniżenie żywotności preosteoblastów po 24, 48, 72 i 96 godz. Stwierdzane zmiany nasilały się wraz z wydłużeniem czasu inkubacji oraz zależały od stężenia jonów fluorkowych. Istotne statystycznie zmiany żywotności komórek w stosunku do hodowli kontrolnej preosteoblastów badacze uzyskali po 24 godz. narażenia na stężenia NaF wynoszące 5×10^{-5} i 5×10^{-4} M ($p < 0,05$) oraz po 96 godz. przy 5×10^{-3} M NaF ($p < 0,01$).

Badania na ludzkich zarodkowych komórkach macierzystych z wykorzystaniem NaF przeprowadzili Fu i wsp. (18). Inkubację prowadzili w 4 przedziałach czasowych: 24, 48, 72 i 96 godz. w obecności różnych stężeń NaF: 1, 2, 4, 6 mM. Badacze wykazali obniżenie żywotności komórek w obecności 2, 4, 6 mM NaF. Jedynie w obecności stężenia 2 mM NaF obniżenie to było zależne od czasu inkubacji. Zmianom tym towarzyszyły zmiana kształtu i powiększenie komórek oraz istotny spadek proliferacji komórek po 96-godzinnej inkubacji. Naukowcy wykazali także zahamowanie cyklu komórkowego oraz apoptozę hodowanych komórek.

Ocenę cytotoksyczności NaF wykonano także w hodowlach odontoblastów – komórek zębinotwórczych. Karube i wsp. (19) zaobserwowali, że wraz ze wzrostem stężenia jonów fluorkowych (2, 5, 10 mM) żywotność komórek malała, a spadek żywotności równy 50% w stosunku do hodowli kontrolnej pojawił się po 24 godz. przy stężeniu NaF wynoszącym 5 mM. NaF spowodował również zwiększoną aktywność kaspazy-3, wzrost fosforylacji MAPK oraz nasilenie fragmentacji DNA.

W przeprowadzonych w niniejszej pracy badaniach oceniano także wpływ znanych antyoksydantów: resweratrolu i kwasu α -liponowego na ludzkie fibroblasty płucne linii IMR-90. Do badań użyto powyższe antyoksydanty w stężeniach: RV (3 i 10 μ M) i LA (25 μ g/ml). Inkubację fibroblastów płucnych prowadzono w obecności różnych kombinacji stężeń badanych antyoksydantów (RV3 + LA25, RV10 + LA25) po 24, 48 i 72 godz. Wykazano, że użyte antyoksydanty nie wpływały niekorzystnie na żywotność komórek.

Wykazane działanie ochronne RV i LA wynika z ich właściwości. Są to dobrze poznane antyoksydanty, których korzystne właściwości w przeciwdziałaniu stresowi oksydacyjnemu wykazano w licznych badaniach (20-25). Zatem brak istotnych zmian w żywotności komórek hodowanych z tymi antyoksydantami lub istotne podwyższenie w stosunku do żywotności komórek w hodowli kontrolnej (bez antyoksydantów) wskazuje na brak szkodliwego działania.

Podobną zależność do przedstawionych w prezentowanej pracy odnośnie cytotoksyczności RV wykazali różni badacze (20-22). Kim i wsp. (20) zbadali wpływ RV na żywotność fibroblastów pochodzących od osób zdrowych, jak również chorych na orbitopatię Gravesa. W hodowlach prowadzonych w obecności 4 stężeń: 10, 30, 50 i 100 μ M, wykazali, że żywotność fibroblastów nie spadła poniżej 95% zarówno w komórkach od osób zdrowych, jak i chorych po 6-godzinnej inkubacji przy stężeniach RV równych bądź mniejszych od 50 μ M. Natomiast obniżenie żywotności komórek badacze wykazali przy wysokim stężeniu w podłożu RV (100 μ M) w odniesieniu do obydwu linii komórek po 6 godz. inkubacji. Natomiast po 24 godz. ponad 85% komórek pochodzących od pacjentów z orbitopatią Gravesa nie wykazało znacznego spadku żywotności po zastosowaniu RV w stężeniu 50 μ M lub mniejszego, natomiast znaczący spadek nastąpił przy 100 μ M RV w porównaniu z cytotoksycznością komórek w hodowli kontrolnej. Niskie stężenia RV (10 lub 30 μ M) nie wykazały istotnych zmian w żywotności komórek po 24 godz. inkubacji.

W badaniach *in vitro* Yoo i Kim (21) wykazali korzystny wpływ RV na żywotność fibroblastów pozyskanych od osób zdrowych oraz z chorobą Gauchera typu II. Hodowlę prowadzili w obecności trzech stężeń RV: 0,1; 1 i 10 μ M, przez 24 godz. Zaobserwowali oni wzrost żywotności komórek pochodzących od osób chorych o 27-49% wraz ze wzrostem stężenia RV w stosunku do hodowli prowadzonej bez dodatku RV ($p < 0,05$).

WNIOSKI

W badaniach wykazano, że fluorek sodu wykazuje cytotoksyczność w stosunku do ludzkich fibroblastów płucnych linii IMR-90, zależną od stężenia w podłożu oraz od czasu inkubacji. Resweratrol i kwas α -liponowy dodane do podłoża łącznie nie wykazują niekorzystnego wpływu na fibroblasty płucne w badaniach *in vitro*, jednakże nie we wszystkich stężeniach. Wykazanie korzystnego wpływu antyoksydantów RV i LA na cytotoksyczność powodowaną przez NaF w stosunku do ludzkich fibroblastów płucnych w różnych dawkach i czasach wskazuje na możliwe korzyści wynikające z ich stosowania przy narażeniu na fluor, np. poprzez uwzględnienie diety zawierającej powyższe antyoksydanty.

KONFLIKT INTERESÓW
CONFLICT OF INTEREST

Brak konfliktu interesów
None

ADRES DO KORESPONDENCJI

Robert Kubina
Katedra i Zakład Patologii
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem
Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu
Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach
ul. Ostrogórska 30, Katowice
tel.: +48 (32) 364-13-54
rkubina@sum.edu.pl

PIŚMIENNICTWO

1. Seńczuk W: Toksykologia współczesna. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2006: 477-481.
2. De Rita D, Creminisi C, Cinnirella A, Spaziani F: Fluoride in the rocks and sediments of volcanic areas in central Italy: total content, enrichment and leaching processes and a hypothesis on the vulnerability of the related aquifers. *Environ Monit Assess* 2012; 184: 5781-5796.
3. Dhar V, Bhatnagar M: Physiology and toxicity of fluoride. *Indian J Dent Res* 2009; 20(3): 350-355.
4. Palmer CA, Gilbert JA: Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: The Impact of Fluoride on Health. *J Acad Nutr Diet* 2012; 112: 1443-1453.
5. Pratap D, Singh D: Impact of fluoride on environment & human health. *IJSSBT* 2013; 1(2): 56-61.
6. Gutiérrez-Salinas J, García-Ortiz L, González JAM et al.: In Vitro Effect of Sodium Fluoride on Malondialdehyde Concentration and on Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase in Human Erythrocytes. *Scientific World J* 2013; 2013: 864718.
7. Varol E, Varol S: Does Fluoride Toxicity Cause Hypertension in Patients with Endemic Fluorosis? *Biol Trace Elem Res* 2012; 150: 1-2.
8. Song DX, Zheng LW, Shen SM, Chen XM: Cytotoxicity of ammonium hexafluorosilicate on human gingival fibroblasts. *Toxicol in Vitro* 2013; 27: 2149-2155.
9. Hiller S, DeKroon R, Hamlett ED, Xu L et al.: Alpha-lipoic acid supplementation protects enzymes from damage by nitrosative and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1860: 36-45.
10. Rochette L, Ghibu S, Richard C et al.: Direct and indirect antioxidant properties of α -lipoic acid and therapeutic potential. *Mol Nutr Food Res* 2013; 57: 114-125.
11. Queiroz AN, Gomes BAQ, Moraes WM, Borges RS: A theoretical antioxidant pharmacophore for resveratrol. *Eur J Med Chem* 2009; 44: 1644-1649.
12. Lançon A, Frazzi R, Latruffe N: Anti-Oxidant, Anti-Inflammatory and Anti-Angiogenic Properties of Resveratrol in Ocular Diseases. *Molecules* 2016; 21(304): 1-8.
13. Wang X, Li S, Cao T et al.: Evaluating biotoxicity with fibroblasts derived from human embryonic stem cells. *Toxicol in Vitro* 2012; 26: 1056-1063.
14. Otsuki S, Sugiyama K, Amano O et al.: Negative regulation of NaF-induced apoptosis by Bad-CaII complex. *Toxicology* 2011; 287: 131-136.
15. Slompo C, Buzalaf CP, Damante CA et al.: Fluoride Modulates Preosteoblasts Viability and Matrix Metalloproteinases-2 and -9 Activities. *Braz Dent J* 2012; 23(6): 629-634.
16. Inkielewicz-Stepniak I, Santos-Martinez MJ, Medina C, Radomski MW: Pharmacological and toxicological effects of co-exposure of human gingival fibroblasts to silver nanoparticles and sodium fluoride. *Int J Nanomedicine* 2014; 9: 1677-1687.
17. Jin-Ha L, Ji-Yeon J, Yeon-Jin J et al.: 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: 340-347.
18. Fu X, Xie F-N, Dong P et al.: High-Dose Fluoride Impairs the Properties of Human Embryonic Stem Cells via JNK Signaling. *PLoS ONE* 2016; 11(2): 1-15.
19. Karube H, Nishitai G, Inageda K et al.: NaF Activates MAPKs and Induces Apoptosis in Odontoblast-like Cells. *J Dent Res* 2009; 88 (5): 461-465.
20. Kim CY, Lee HJ, Chae MH et al.: Therapeutic Effect of Resveratrol on Oxidative Stress in Graves' Orbitopathy Orbital Fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56(11): 6352-6361.
21. Yoo S, Kim JB: Anti-apoptotic and Beneficial Metabolic Activities of Resveratrol in Type II Gaucher Disease. *Biol Pharm Bull* 2015; 38: 913-918.
22. Boumaza S, Belkebir A, Neggazi S et al.: Therapeutic Role of Resveratrol and Quercetin on Aortic Fibroblasts of Psammomys obesus After Oxidative Stress by Hydrogen Peroxide. *Am J Ther* 2018; 25(3): e299-e313.
23. Jia L, Zhang Z, Zhai L, Bai Y: Protective effect of liponic acid against acrolein-induced cytotoxicity in IMR-90 human fibroblasts. *J Nutr Sci Vitaminol* 2009; 55: 126-130.
24. Wang YJ, Yang MC, Pan MH: Dihydrolipoic acid inhibits tetrachloroquinone-induced tumor promotion through prevention of oxidative damage. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 3739-3748.
25. Xu Y, Zhou X, Shi C et al.: α -Lipoic acid protects against the oxidative stress and cytotoxicity induced by cadmium in HepG2 cells through regenerating glutathione regulated by glutamate-cysteine ligase. *Toxicol Mech Methods* 2015; 25(8): 596-603.

nadesłano: 10.04.2020
zaakceptowano do druku: 4.05.2020