

Possible interactions of fluoride, calcium and fatty acids in atherosclerotic plaques

Możliwe interakcje fluorków, wapnia i kwasów tłuszczowych w blaszkach miażdżycowych izolowanych z tętnic szyjnych

Ewa Stachowska¹, Dariusz Chlubek¹, Barbara Dołęgowska¹, Piotr Gutowski², Katarzyna Jakubowska¹, Iwona Nociń¹, Zygmunt Machoy¹, Halina Szumiłowicz², Miłosław Cnotliwy²

¹Department of Biochemistry and Chemistry (Katedra i Zakład Biochemii i Chemii), ²Department of Vascular Surgery, Pomeranian Academy of Medicine, Szczecin, Poland (Klinika Chirurgii Naczyniowej Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie, Polska)

Abstract

Background. Quantitative and qualitative changes in the mineral composition of the arterial wall seem to be engaged in the formation of the atherosclerotic plaque. The aim of this study was to determine the content of fluoride and calcium in atherosclerotic plaques and to understand the process of fluorine ions binding into the plaque.

Material and methods. Plaques were obtained from patients operated for atherosclerosis of carotid arteries. Median content of fluoride and calcium in the atherosclerotic plaques were 0.75 and 207 $\mu\text{mol/g}$, respectively.

Results. No correlation between the content of fluoride and calcium ($R = 0.11$, $p = 0.60$) was disclosed.

Conclusions. We are of the opinion that fluoride reacts with fatty acids of the plaque, disrupting carbon bonds of the fatty acid molecule. Fluoride is a component of the atherosclerotic plaque but apparently is not deposited together with calcium ions. Fluoride is capable of interacting with fatty acids of the atherosclerotic plaque.

Key words: fluoride, calcium, fatty acids, atherosclerotic plaque

Streszczenie

Wstęp. Zmiany ilościowe oraz jakościowe składników mineralnych w ścianie tętniczej mogą być jednym z czynników stymulujących rozwój blaszki miażdżycowej. Celem niniejszej pracy było oznaczenie zawartości fluorku oraz wapnia w blaszce oraz zbadanie sposobu wiązania jonu fluorkowego w złożu miażdżycowym.

Materiał i metody. Pomiar zawartości fluorku i wapnia prowadzono w blaszkach miażdżycowych uzyskanych od chorych operowanych z powodu zaawansowanej miażdżycy tętnic szyjnych. Zmierzona mediana zawartości fluorku w blaszce osiągnęła 0,75 $\mu\text{mola/gram}$.

Wyniki. Nie odnotowano istotnej statystycznie korelacji pomiędzy zawartością fluorku oraz wapnia w blaszce miażdżycowej ($R = 0,11$, $p = 0,60$).

Wnioski. Fluorek może reagować z zawartymi w blaszce miażdżycowej kwasami tłuszczowymi, prawdopodobnie przyczyniając się do degradacji wiązania pomiędzy atomami węgla w cząsteczce kwasu tłuszczowego. Fluorek jest składnikiem blaszki miażdżycowej, ale nie odkłada się w niej w połączeniu z jonami wapnia i może on oddziaływać w blaszce z zawartymi w niej kwasami tłuszczowymi.

Słowa kluczowe: fluorek, wapń, kwasy tłuszczowe, blaszka miażdżycowa

Introduction

The disproportions in mineral constituents of the arterial wall have been linked to the process of atherogenesis [1]. The changes in the concentration of copper,

Wstęp

Zachwianie równowagi stężeń składników mineralnych w ścianie tętniczej może być jednym z czynników stymulujących rozwój miażdżycy [1]. Wydaje się, że zmia-

Address for correspondence (Adres do korespondencji):

Katedra i Zakład Biochemii i Chemii, Pomorska Akademia Medyczna, Al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin, Poland,
tel/fax: +48 (0 91) 466 15 16, e-mail ewast@sci.pam.szczecin.pl

zinc, calcium, or magnesium in serum and arterial wall are accompanied by the disorders of lipid metabolism and dysfunction of some enzymes [1]. The research has also focused on other trace elements and fluorine has recently attracted much attention. Unfortunately, inconsistent reports have appeared on the role of the fluorine ion in atherogenesis. Louma et al. have advocated the protective effect of fluoride [2, 3] as revealed by favorable changes in the lipid profile and reduced calcification of the aortic wall (and other organs) in hypercholesterolemic rats maintained on a diet supplemented with small doses of fluoride [2]. The studies in animals after heart transplantation have disclosed that sodium fluoride alters the properties of endothelium, key cells in atherogenesis [4–6]. Fluorine-containing compounds, like sulfone derivatives, adversely affect the activity of several enzymes, among them lipoprotein lipase regulating serum levels of lipids [7], elastase controlling the proliferation of smooth muscle cells [8], and metalloproteinase participating in the degradation of fibrin in the vascular wall [9].

The following questions, we would like to answer in this paper, have emerged:

- does fluorine accumulate in atherosclerotic plaques?
- does calcification of the plaque support the accumulation of fluorine?
- what is the role of fatty acids in the uptake of fluorine by the plaque?

Material and methods

The atherosclerotic plaques were collected from 74 patients (13 females and 61 males, aged > 60 years) operated due to atherosclerotic stenosis of the carotid arteries. The people were not exposed to harmful concentration of fluoride [10], and its concentration in serum of people living in the area of Szczecin was low. The typical diet for this part of Europe was used by the patients. None of them used drugs containing fluoride, fluoride enriched water and food. The muscle layer was carefully removed and only uncalcified plaques were used. Calcium and fluoride concentrations were measured in the central part of the plaque and expressed per tissue weight.

Measurement of fluoride and calcium content in atherosclerotic plaques

Altogether, 34 plaques were examined. Each plaque was pulverized in a metal homogenizer placed in liquid nitrogen. Chromatography was used to determine fluoride content in 0.5 g tissue powder [11]. Calcium was measured in tissue samples weighing 30 mg, mineralized in 65% HNO₃ and diluted with demineralized water. Atomic absorbance spectrometry (PU 9100 X instrument

ny relacji stężeń pierwiastków, takich jak miedź, cynk, wapń oraz magnez w surowicy krwi i ścianie tętniczej mogą powodować zaburzenia metabolizmu lipidów, a także wykazali niektórych białek enzymatycznych [1]. W literaturze pojawiły się sprzeczne doniesienia na temat roli fluorku w patogenezie miażdżycy. Louma i wsp. wskazali na pozytywną rolę fluorku jako czynnika potencjalnie zapobiegającego arteriosklerozie [2, 3]. W swoich badaniach zanotowali korzystne zmiany w profilu lipidowym u szczurów z hipercholesterolemią, a także wykazali ochronę przed kalcyfikacją ściany aorty (oraz innych organów wewnętrznych), wynikającą z suplementacji zwierząt małymi dawkami fluorku [2]. Natomiast badania innych autorów wskazują, że fluorek sodu wpływa na właściwości endotelium — komórek odgrywających kluczową rolę w patogenezie miażdżycy u zwierząt po przeszczepach serca [4–6]. Istotny jest fakt, że związki fluorku np. pochodne sulfonowe zmieniają aktywność enzymów regulujących stężenie lipidów w osoczu (lipazy lipoproteinowej [7]) lub elastazy [8] i metalloproteinazy — enzymów biorących udział w utrzymaniu prawidłowego tempa degradacji włókien fibryny w ścianie naczynia oraz prawidłowego tempa proliferacji mięśni gładkich [9].

Celem niniejszej pracy było określenie:

- czy i w jakim stopniu jon fluorkowy może odkładać się w obszarze blaszki miażdżycowej?
- czy postępujący proces zwapnienia blaszek może być czynnikiem stymulującym gromadzenie w nich fluorku?
- jaki jest udział kwasów tłuszczowych w procesie wiązania fluorku w blaszce?

Materiał i metody

Materiał pobierano ze zmienionych chorobowo fragmentów naczyń krwionośnych uzyskanych od 74 chorych (13 kobiet, 61 mężczyzn, wszyscy badani > 60 rż.), operowanych z powodu zaawansowanej miażdżycy tętnic szyjnych. Chorzy nie byli ekspozowani na szkodliwe dawki fluorku, a stężenie tego jonu w osoczu było niskie [10]. Pacjenci stosowali dietę typową dla tej części Europy. Żaden z nich nie używał leków zawierających związki fluorku, wody ani żywności wzbogaconej fluorkiem. Z naczyń krwionośnych usuwano blaszkę miażdżycową, dokładnie oddzielając ją od warstwy mięśniówki. Do badań wybierano blaszki bez widocznych cech zwapnienia. Do oznaczania zawartości wapnia i fluorku zawsze wybierano środkową część blaszki. Zawartość jonów w blaszce obliczano na podstawie masy mokrej tkanki.

Oznaczanie fluorku i wapnia w blaszkach miażdżycowych

Do badań użyto 34 blaszki miażdżycowe. Każdą blaszkę homogenizowano w schłodzonym ciekłym azotem

from Philips) was performed in 0.5% lanthanum buffer and an air-acetylene flame at 422.7 nm and the results were computer-processed using a calibration curve [12].

Measurement of fatty acids in atherosclerotic plaques and the effect of sodium fluoride

Twenty plaques were pulverized as above, divided into aliquots and incubated for 74 h with 0.025, 0.25, or 2.5 mmol/L NaF at ambient temperature. One aliquot served as control and was incubated with demineralized water. Margaric acid (C17:0) was used as a standard. Fatty acids were extracted according to Folch [13], methylated with a solution of 14% BF₃ in methanol (20 min, 70°C) and separated in a gas chromatograph (Perkin-Elmer 8400) equipped with a 100 m RTX 2330 column and a split/splitless injector. The initial and final oven temperatures were 165 and 250°C and the temperature gradient was 2°C/min. The linear velocity of carrier gas (helium) was 20 cm/s. Peaks were identified according to retention times of a standard mixture of fatty acid methyl esters.

Measurement of the effect of ionic strength on fatty acid composition

The experiment was essentially as described above, with the exception that NaF was replaced by NaCl. Twenty plaques were used.

Statistics was carried out using with non-parametric tests, preceded by examination of the distribution. Correlations were checked using Spearman's R coefficient. The 0.05 level of significance was taken. Changes in the fatty acid composition were studied using Friedman's ANOVA test [14] and taking the level of significance as 0.001. The STATISTICA PI 5.0 software package was used.

Results

Our results confirm that fluoride is present in human atherosclerotic plaques and that accumulation of this element apparently depends on its intake (environmental pollution, water, food, and fluorine-containing medicines). Fluoride content ranged from 0.0175 to 8.4 μmol/g wet tissue (median = 0.75 μmol/g). In the first and fourth quartiles it was 0.41 and 2.5 μmol/g, respectively (Tab. 1).

Median calcium content in atherosclerotic plaques was 207 μmol/g, ranging from 5.3 to 4650 μmol/g. In the first and fifth quintiles it was 54.5 and 763 μmol/g, respectively (Tab. 1). No correlation was noted between fluoride and calcium content ($R = 0.111$, $p = 0.60$).

Concentrations of chosen fatty acids (C16:0, C18:1, C18:2) in relation to rising concentration of fluoride are

metalowym homogenizatorze i kruszono na proszek. Uzyskany proszek ważono i dzielono na dwie części: 0,5 g do mierzenia zawartości fluorku, 30 mg do oznaczenia zawartości wapnia w blaszce. Zawartość fluorku w blaszce miażdżycowej oznaczano chromatograficznie [11]. Zawartość wapnia w blaszkach miażdżycowych oznaczono za pomocą spektrometru absorpcji atomowej PU 9100 X Philips w 0,5-procentowym buforze lantanowym [12]. Mineralizowano 30 mg próbki w 65% HNO₃, rozcieńczano wodą demineralizowaną i dokonywano pomiaru absorpcji (w płomieniu powietrzno-acetylenowym, długość fali wynosiła 422,7 nm). Wyniki odczytywano komputerowo z krzywej kalibracyjnej wartości stężeń oraz przeliczano na użytą do analizy masę naważki [12].

Analiza ilościowa i jakościowa kwasów tłuszczowych blaszki miażdżycowej

Do pomiaru użyto 20 blaszek miażdżycowych. Każdą z blaszek rozdrabniano na jednolitą masę w schłodzonym ciekłym azocie homogenizatorze metalowym. Uzyskany jednolity proszek ważono i dzielono na 2 równe części inkubowane w różnych stężeniach NaF: 0,025 mM, 0,25 mM, 2,5 mM (74-godzinna inkubacja w temperaturze pokojowej). Próbę kontrolną (bez NaF) inkubowano w demineralizowanej wodzie przez 74 h w temperaturze pokojowej.

Do obydwu grup dodano kwas margarynowy (C17:0) jako standard wewnętrzny. Kwasy tłuszczowe ekstrahowano z blaszek metodą Folcha [13], następnie metylowano za pomocą 14-procentowego BF₃ w CH₃OH, przez 20 min w temperaturze 70°C. Analizę estrów metylowych kwasów tłuszczowych przeprowadzano za pomocą chromatografu gazowego Perkin-Elmer 8400 zaopatrzonego w kolumnę RTX 2330, 105 m, w następujących warunkach: temperatura pieca wynosiła 165–250°C, przyrost temperatury — 2°C/min, gaz — nośny hel, szybkość przepływu — 20 cm/s.

Oznaczenie wpływu siły jonowej

Do pomiarów użyto 20 blaszek miażdżycowych. Każdą blaszkę kruszono na proszek w schłodzonym homogenizatorze metalowym, ważono i dzielono na dwie równe części:

- badaną inkubowaną w różnych stężeniach NaCl: 0,025 mM, 0,25 mM, 2,5 mM (przez 72 h w temp. pokojowej);
- kontrolną bez NaCl — inkubowaną przez 74 h w temp. pokojowej w wodzie demineralizowanej.

Do obydwu grup podano kwas margarynowy jako standard wewnętrzny. Kwasy tłuszczowe ekstrahowano, metylowano i analizowano chromatograficznie w sposób opisany powyżej.

Table 1. Content of fluoride and calcium in atherosclerotic plaques from patients operated due to carotid atherosclerosis
Tabela 1. Zawartość fluorku i wapnia w blaszkach miażdżycowych uzyskanych od pacjentów z miażdżycą tętnic szyjnych

	Quartiles of fluoride and calcium content in atheromatous plaque Kwartyle zawartości fluorku i wapnia w blaszce miażdżycowej				Mediana
	1	2	3	4	
Fluoride Fluorek [$\mu\text{mol/g}$]	< 0.4123	0.4123–0.7532	0.7533–2.4820	> 2.4820	0.7532
Calcium Wapń [$\mu\text{mol/g}$]	< 53.5000	53.5000–207.1875	207.1876–763.3000	> 763.3000	207.1875

presented in Figure 1. Figure 2 shows the effect of ionic strength on the fatty acid composition (C16:0, C18:1, C18:2) of atherosclerotic plaques. The content of saturated (SFA), monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) in plaques incubated with NaF is presented in Figure 3.

Changes in the concentration of short-chain saturated fatty acids (C6:0, C12:0) in relation to rising concentrations of NaF are shown in Figure 4.

Discussion

The accumulation of fluoride and calcium has been noticed in other tissues and organs. The content of fluorine in aorta for example may reach 8.4 g/kg [15]. High levels and a strong correlation with calcium have been reported for the human placenta [16].

We are inclined to explain the lack of correlation between fluoride and calcium content in atherosclerotic plaques by different mechanisms responsible for the accumulation of both elements. Fluoride appears to bind fatty acids which are the principal components of a mature plaque [17, 18]. Our findings support this argument. Incubation of plaque material with NaF solutions resulted in reduced content of saturated (C16:0), mono- (C18:1) and polyunsaturated (C18:2) fatty acids (Fig. 1). We have deliberately excluded the influence of ionic strength in this case (Fig. 2). The reduction was independent of the number of unsaturated bonds in the fatty acid molecule (Fig. 3). We hypothesize that fluoride leads to breakdown of fatty acid molecules. This would explain why the content of short-chain fatty acids (C6:0, C12:0) was not decreased (Fig. 4) as was for long-chain fatty acids (Fig. 1, 3).

Our findings require further studies before reliable conclusions can be drawn on interactions between fluorine and fatty acids. It has been well established that PUFA are particularly susceptible to degradation by free radicals and that the oxidation of polyunsaturated fatty acids in low density lipoproteins (LDL) plays an important role in atherogenesis [19, 20]. Reports from the

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. Analizę statyczną poprzedzono oceną normalności rozkładów. Do analiz posłużono się testami nieparametrycznymi. Dla oceny współzależności pomiędzy zmianami zawartości poszczególnych pierwiastków wyznaczono współczynniki korelacji R Spearmana. Istotność statystyczną dla tych pomiarów przyjęto na poziomie nie wyższym niż 0,05. Do oznaczenia zmian zawartości kwasów tłuszczowych posłużono się testem ANOVA Friedmana [14], poziom istotności wynosił 0,001. Opracowania statystycznego wyników dokonano za pomocą programu statystycznego Statistica PL v 5.0.

Wyniki

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki wskazują na obecność fluorku w blaszce miażdżycowej. Stężenie fluorku w blaszce wydaje się być zależne od ekspozycji na fluorki (przebywanie w terenie zanieczyszczonym, używanie fluorowanej żywności i wody, przyjmowanie leków zawierających fluorek itd.). Zmierzona przez autorów pracy zawartość fluorku w blaszce miażdżycowej wahała się w granicach 0,0175–8,4 $\mu\text{M/g}$ mokrej tkanki (mediana wyniosła 0,75 $\mu\text{M/g}$). Kwartyłe zawartości fluorku i wapnia w blaszkach wynosiły od 0,41 $\mu\text{M/g}$ blaszki w pierwszym kwartylu – po 2,5 $\mu\text{M/g}$ w kwartylu czwartym (tab. 1).

Mediana zawartości wapnia w blaszkach miażdżycowych wyniosła 207 $\mu\text{M/g}$ mokrej tkanki. Zmierzone minimum zawartości wapnia to 54,5 $\mu\text{M/g}$, maksimum — 763 $\mu\text{M/g}$ (tab. 1). Autorzy niniejszej pracy nie odnotowali korelacji na istotnym statystycznie poziomie pomiędzy zawartością fluorku i wapnia ($R = 0,111$, $p = 0,6$).

Zmiany zawartości kwasów tłuszczowych (C16:0, C18:1, C18:2) jako odpowiedź na wzrastające stężenie fluorku przedstawiono na rycinach 1 i 2. Zmiany te wskazują na wpływ siły jonowej na zawartość wybranych kwasów tłuszczowych (C16:0, C18:1, C18:2) w blaszkach miażdżycowych. Blaszkę inkubowano we wzrastającym stężeniu NaCl: 0,025 mM, 0,25 mM, 2,5 mM lub bez dodatku NaCl (w grupie kontrolnej). Na rycinie 3

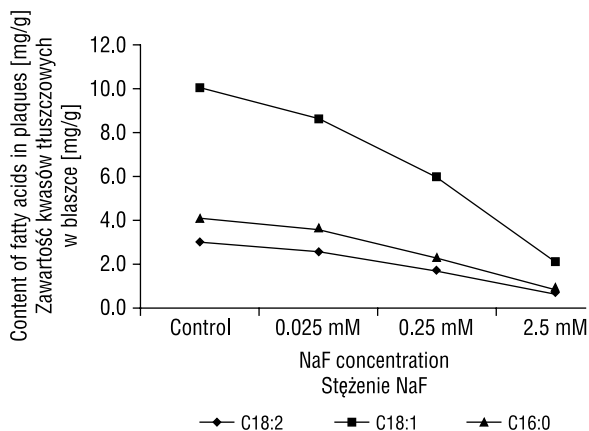


Figure 1. Changes in the concentrations of fatty acids (C16:0, C18:1, C18:2) in response to rising concentrations of NaF

Rycina 1. Zmiany stężenia kwasów tłuszczowych (C16:0, C18:1, C18:2) w odpowiedzi na wzrastające stężenie NaF

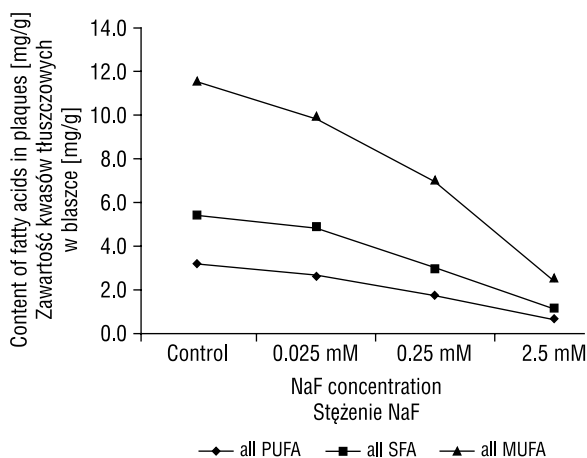


Figure 3. Concentrations of saturated (SFA), monounsaturated (MUFA), and polyunsaturated fatty acids (PUFA) in atherosclerotic plaques. Plaques were incubated with rising concentrations of Na F (0.025 mM, 0.25 mM, 2.5 mM)

Rycina 3. Stężenie nasyconych (SFA), mononienasyconych (MUFA) i polinienasyconych kwasów tłuszczowych w blaszkach miażdżycowych. Blaszkę inkubowano we wzrastających stężeniach NaF (0,025 mM, 0,25 mM, 2,5 mM)

last fifteen years on the participation of fluorine ions in free radical reactions are increasing in favor of fluoride-induced generation of oxygen free radicals [20, 21]. The formation of fluorine-fatty acid complexes (D, L-fluoropalmitic acid) has been documented [22] and the effect of fluoride on the lipid metabolism of the cell has been described [23–26].

Fluorine complexes forming in atherosclerotic plaques may be responsible for alterations in physicochemical properties of the plaque, such as resistance to arterial pressure or susceptibility to shear forces, which ultimately allow for plaque rupture and embolisation.

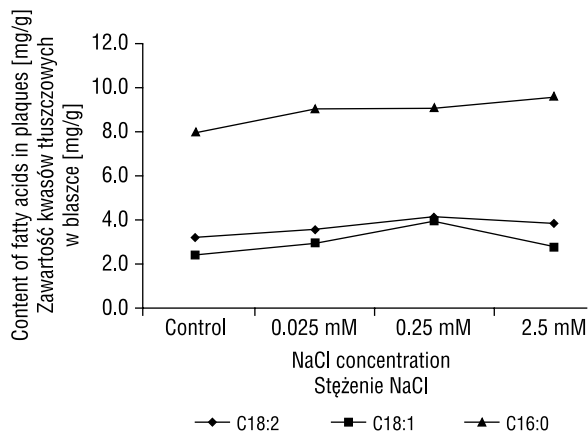


Figure 2. The effect of ionic strength on the concentrations of fatty acids (C16:0, C18:1, C18:2) in atherosclerotic plaques. Plaques were incubated with rising concentrations of NaCl (0.025 mM, 0.25 mM, 2.5 mM)

Rycina 2. Wpływ siły jonowej na stężenie kwasów tłuszczowych (C16:0, C18:1, C18:2) w blaszkach miażdżycowych. Blaszkę były inkubowane we wzrastających stężeniach NaCl (0,025 mM, 0,25 mM, 2,5 mM)

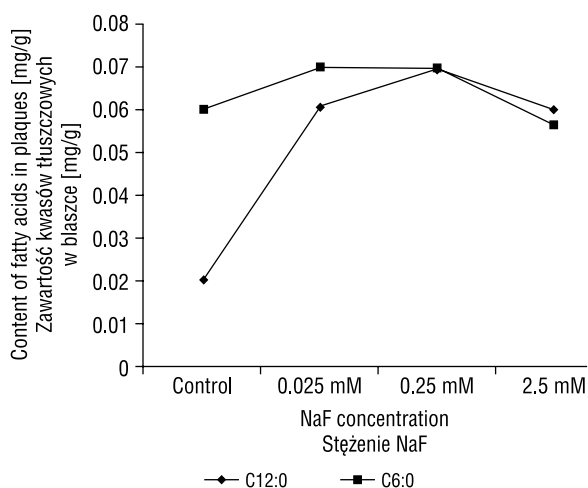


Figure 4. Changes in the concentration of short-chain saturated fatty acids (C6:0, C12:0) in response to rising concentrations of NaF

Rycina 4. Zmiany w stężeniu krótkołańcuchowych nasyconych kwasów tłuszczowych (C6:0, C12:0) w odpowiedzi na wzrastające stężenie NaF

przedstawiono sumaryczną zawartość kwasów tłuszczowych: nasyconych (SFA), mononienasyconych (MUFA) oraz wielonienasyconych (PUFA) izolowanych z blaszek miażdżycowych inkubowanych bez fluorku oraz w różnych stężeniach NaF: 0,025 mM, 0,25 mM, 2,5 mM.

Zmiany zawartości krótkołańcuchowych nasyconych kwasów tłuszczowych: C 6:0, oraz C12:0 w blaszce miażdżycowej w odpowiedzi na wzrastające stężenie fluorku przedstawiono na rycinie 4.

Further studies are necessary to elucidate the role of fluorine in atherogenesis.

Conclusions

On the basis of the present findings the following conclusions have been drawn:

1. Fluorine is deposited in atherosclerotic plaques independently of calcium (no correlation was found between fluoride and calcium content);
2. Fluorine ions apparently react with fatty acids present in the atherosclerotic plaque.

References

1. Kleerekoper M (1994) Non-dental tissue effects of fluoride. *Adv Dent Res*, 8: 32–38.
2. Louma H, Jauhianinen M, Alakujala P, Nevalainen T (1998) Seven weeks feeding of magnesium and fluoride modifies plasma lipids of hypercholesterolaemic rats in late growth phase. *Magnes Res*, 11: 271–282.
3. Louma H, Medsa-Katela T, Jauhianen M, Alakujala P, Korhonen A, Nevalainen T (1997) Effect of dietary fluoride and magnesium supplements on cyclic adenosine monophosphate (cAMP), calcium and magnesium levels in aorta of genetically hypercholesterolaemic RICO rats. *Scand J Clin Lab Invest*, 57: 421–425.
4. Perrault LP, Bidouard JP, Janiak P, Villeneuve N, Bruneval P, Vilaine JP, Vanhoutte PM (1997) Time course of coronary endothelial dysfunction in acute untreated rejection after heterotopic heart transplantation. *J. Heart Lung Transplant*, 16: 143–157.
5. Perrault LP, Mahlberg F, Bruegnot C, Bidouard JP, Villeneuve N, Vilaine JP, Vanhoutte PM (2000) Hypercholesterolemia increases coronary endothelial dysfunction, lipid content, and accelerated atherosclerosis after heart transplantation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20: 728–736.
6. Perrault LP, Bidouard JP, Janiak P, Villeneuve N, Bruneval P, Vilaine JP, Vanhoutte PM (1999) Impairment of G-protein-mediated signal transduction in the porcine coronary endothelium during rejection after heart transplantation. *Cardiovasc Res*, 43: 457–470.
7. Mamputu JC, Desfaits AC, Renier G (1997) Lipoprotein lipase enhances human monocyte adhesion to aortic endothelial cells. *J Lipid Res*, 38: 1722–1729.
8. Fukuo K, Morimoto S, Jiang B, Inoue T, Nabata T, Ogiwara T (1994) Elastase enhances cAMP accumulation and the inhibition of DNA synthesis induced by OP-41483, a stable prostacyclin analogue, in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 110: 111–117.
9. Katsuda S, Okada Y, Okada Y, Imai K, Nakanishi I (1994) Matrix metalloproteinase-9 (92 gelatinase/type IV collagenase equals gelatinase B) can degrade arterial elastin. *Am J Pathol*, 145: 1208–1218.
10. Zawierła J, Dąbkowska E, Jakubowska K, Olszewska M, Nociński I (1998) Zawartość fluoru, miedzi, żelaza, cynku i seleniu w osoczu u ludzi zdrowych, zamieszkujących w Szczecinie i jego okolicach. *Metabolizm Fluoru*, VIII: 200–2004.

Dyskusja

Zjawisko gromadzenia fluorku i wapnia zaobserwowano w innych ludzkich tkankach i organach wewnętrznych np. aorcie, w której zawartość fluorku osiągać może nawet wartość 8,4 mg/g [15] lub w ludzkim łożysku, w którym wykazano istnienie dodatniej korelacji pomiędzy zawartością jonów fluorku i wapnia [16].

Istnienie braku korelacji pomiędzy obydwojoma jonami (fluorkiem i wapniem) w blaszce miażdżycowej można tłumaczyć istnieniem innego mechanizmu gromadzenia fluorku w złogu miażdżycowym. Mechanizmem tym może być tworzenie związków fluorkowo-lipidowych z kwasami tłuszczowymi — podstawowymi komponentami dojrzałej blaszki miażdżycowej [17, 18]. Zdają się to potwierdzać wyniki uzyskane przez autorów niniejszej pracy. Inkubacja złogów miażdżycowych z roztworem fluorku spowodowała spadek zawartości kwasów tłuszczowych — zarówno nasyconych (C16:0), jak i mono oraz polinienasyconych (C18:1, C18:2) — w stosunku do grupy kontrolnej (blaszki inkubowane bez dodatku fluorku) (ryc. 1). Jednocześnie autorzy wykluczyli działanie siły jonowej na zawartość kwasów tłuszczowych w blaszce (ryc. 2). Zawartość kwasów tłuszczowych w blaszce ulegała zmniejszeniu niezależnie od stopnia nasycenia kwasu tłuszczowego (ryc. 3). Należy zatem rozważyć, jaki może być prawdopodobny mechanizm oddziaływania fluorku na kwasu tłuszczowe.

Wydaje się, że fluorek może degradować łańcuchy węglowe kwasów tłuszczowych do krótszych fragmentów. W ten sposób można wytłumaczyć ubytek zarówno długołańcuchowych kwasów tłuszczowych z blaszki (ryc. 1, 3), jak i niemalejącą zawartość dwóch krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych C6:0 i C 12:0 w blaszkach (ryc. 4) (być może częściowo spowodowaną wzrostem zawartości krótkich fragmentów zdegradowanych długołańcuchowych kwasów tłuszczowych).

Niniejsze wyniki wymagają dalszych badań, które wyjaśnią mechanizm przedstawionego w tej pracy zjawiska. Dotychczasowe dane z piśmiennictwa wskazują, że wiązania nienasycone w PUFA są szczególnie podatne na wszelkie reakcje wolnorodnikowe, a w patogenezie miażdżycy na szczególną uwagę zasługuje proces utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w cząstkach lipoprotein o małej gęstości LDL [19]. Utlenione LDL odgrywają kluczową rolę w pogłębianiu procesów miażdżycowych [20]. Doniesienia z ostatnich kilkunastu lat wskazują na istotny udział fluorków w procesach wolnorodnikowych, w części z nich wskazują się na stymulujące działanie fluorków na generowanie wolnych rodników tlenowych [20, 21]. W piśmiennictwie

11. Fresen JA, Cox FH, Witter MJ (1968) The determination of fluoride in biological materials by means of gas chromatography. *Pharm Weekblad*, 103: 909–1003.
12. Ogonski T, Radlinska J, Samujło D, Nocen I (1996) Influence of chewing gum with sodium fluoride on the human tooth enamel fluoride content in 13-year-old children affected by caries. *Therapeutic Uses of Trace Elements*, Neve et al. Plenum Press, New York: 313–316.
13. Folch J, Lees M, Sloane HA (1957) Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 226: 497–509.
14. Spilker B, Schoenfelder J (1993) Presentation of clinical data analysis. *Practic Approach*. Oxford University Press, Oxford: 67.
15. Waldbott GL, Burgstahler AW, McKinney H (1978) Fluoridation the great dilemma. *Colorado Press. Inc.*, 151–152.
16. Chlubek D, Poreba R, Machalinski B (1998) Fluoride and calcium distribution in human placenta. *Fluoride*, 31: 131–136.
17. Felton CV, Crook D, Davies MJ, Oliver MF (1993) Lipid and fatty acid distribution in nonulcerated and ulcerated human aortic plaques. *J Vasc Med Biol*, 4: 228–234.
18. Felton CV, Crook D, Davies MJ, Oliver MF (1994) Dietary polyunsaturated fatty acids and composition of human aortic plaques. *Lancet*, 334: 1195–1196.
19. Parthasarathy S, Khoo C, Miller E, Barnett J, Witztum JL, Steinberg D (1990) Low density lipoprotein rich in oleic acid is protected against oxidative modification: Implications for dietary prevention of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci*, 87: 3894–3898.
20. Della Bianca V, Grześkowiak M, Dusi S, Rosi F (1988) Fluoride can activate respiratory burst independently of Ca^{+2} stimulation of phosphoinositide turnover, and protein kinase C translocation in primed human neutrophils. *Bioch Bioph Res Comm*, 150: 955–964.
21. Toper R, Aviram A, Aviram I (1987) Fluoride mediated activation of guinea pig neutrophils. *Biochim Biophys Acta*, 931: 262.
22. Soltysiak RM, Matsuura F, Bloomer D, Sweeley CC (1984) D, L alpha — fluoropalmitic acid inhibits sphingosine base formation and accumulates in membrane lipides of cul-

opisano zjawisko tworzenia kompleksów fluorowych z kwasami tłuszczowymi (kwas D, L fluoropalmitynowy) [22]. Znany jest także wpływ jonu fluorkowego na metabolizm lipidowy komórki [23–26].

Wiązanie fluorku w blaszce może być jednym z czynników zmieniających parametry fizyko-chemiczne blaszki np. wytrzymałość na działanie ciśnienia tętniczego, podatność na rozrywanie i przez to tendencje do tworzenia zatorów. Dlatego niezbędne są prace, które pomogą jednoznacznie określić rolę fluorku w patogenezie miażdżycy.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdza się, że:

1. Fluorek odkłada się w blaszkach miażdżycowych, ale nie wykazano korelacji pomiędzy zawartością fluorku i wapnia.
2. Prawdopodobnie fluorek może reagować z kwasami tłuszczowymi zawartymi w blaszce miażdżycowej.

-
- ture mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*, 792: 214.
 23. Philbert C, Dousset JC, Rioufol C, Bourbon P (1991) Effect of hydrogen fluoride inhalation on lipid metabolism in guinea pigs. *Artery* 18: 226–266.
 24. McMurchie EJ, Patten GS (1998) Dietary cholesterol influences cardiac beta-adrenergic receptor adenylate cyclase activity in the marmoset monkey by changes in membrane cholesterol status. *Biochim Biophys Acta*, 942: 324–332.
 25. Hohenegger M, Huber I, Skolek-Winnisch R, Vermes M (1986) Metabolism of the fatty acids (FA) and triacylglycerol (TG) in acute and subacute fluoride intoxication of the rat. *Arch Toxicol*, 56: 285–289.
 26. Townsend D, Singer L (1977) Effect of fluoride on the serum lipids of guinea pigs. *J Nutr*, 107: 97–103.