

Т. В. Попруженко, А. С. Богдан

Дозо-зависимые биологические эффекты фторид-иона в экспериментах на *tetrahymena pyriformis*

Биологические эффекты фторид-иона, используемого для профилактики кариеса зубов, изучены в экспериментах на тест-культуре инфузорий *Tetrahymena pyriformis*. Условия хронического эксперимента соответствовали фторнагрузке взрослого человека в диапазоне от 0,5 до 6,0 мгF/сутки, условия пролонгированного эксперимента – фторнагрузке от 0,5 до 4,0 мгF/сутки. Отмечены фазовые колебания показателей активности биологических процессов в популяции под влиянием различных уровней содержания фторида в среде культивирования. Наибольшие отклонения, превышающие 20% от контрольных показателей роста численности инфузорий, наблюдались в условиях, соответствующих фторнагрузке человека более 2,9 мг F/сутки. Определено, что изменения динамики роста популяции и состояния отдельных особей под влиянием пожизненного применения фторидов имеют не генотипический, но фенотипический характер. Ключевые слова: фторид-ион, профилактика кариеса зубов, безопасность пожизненного применения, биологическое тестирование, инфузории *Tetrahymena pyriformis*.

Papruzhenska T.V., Bogdan A.S. DOSE-DEPENDENT BIOLOGICAL EFFECTS OF FLUORINE-ION IN EXPERIMENTS ON TETRAHYMENA PYRIFORMIS

The biological effects made by fluorine-ion were studied on test-culture *pyriformis*. Conditions of the chronic experiment, which lasted as long as a generation of infusoria lived, corresponded to fluorine intake of an adult, namely from 0.5 to 6.0 mgF/24 hours; conditions of the prolonged experiment – to fluorine intake from 0.5 to 4.0 mgF/24 hours and were applied during the lives of 7 generations of the culture. Biological processes activity index in the population were noticed to have phasal oscillations under the influence of different levels of fluorine content in culture medium. The largest deflection that exceeds 20 per cent of control indexes of infusoria number growth, were observed in the conditions corresponded to person's fluorine intake of more than 2.9 mgF/24 hours. It was defined that changes in the dynamics of population growth as well as in a state of certain individuals as a result of a lifelong use of fluorine are not of a genotypic but of a phenotypic character.

Key words: fluoride-ion, caries prevention, safety of lifelong usage, biological testing, infusoria *Tetrahymena pyriformis*.

Соединения фтора широко и успешно применяются для предупреждения кариеса зубов на протяжении последних пятидесяти лет, именуемых благодаря этому «золотой эрой» стоматологической профилактики [1, 6]. Однако до сих пор не находит однозначного решения вопрос о пределах безопасности системного применения этого галогена, относящегося по параметрам острой токсичности к веществам первого класса опасности [3, 10]. В качестве верхней границы безопасной фторнагрузки взрослого человека предложены величины 1,0 – 1,5 - 2,9 – 4,0 мгF/сутки [3,4,5,6,]. Этот вопрос приобретает особую важность в связи с «пожизненным» характером коммунальных программ, предполагающих

применение фторированной питьевой воды или фторированной поваренной соли [5, 7, 8, 9].

Целью исследования явилось изучение биологических эффектов различных доз фторид-иона в диапазоне, соответствующем фторнагрузке человека от 0,5 до 6,0 мгF/сутки, в эксперименте на популяции одноклеточных организмов инфузорий *Tetrahymena pyriformis*, используемых в качестве тест-объекта при проведении комплексных гигиенических токсикологических исследований [2].

Материалы и методы.

В стандартную среду культивирования инфузорий вносили фтор в форме калиевой соли фтористоводородной кислоты $KF \cdot 2H_2O$ в концентрациях, соответствующих фторнагрузке человека 0,5 мгF/сут (0,000025 мгF/мл), 1,0 мгF/сут (0,00005 мгF/мл), 1,5 мгF/сут (0,000075 мгF/мл), 2,9 мгF/сут (0,000145), 3,5 мгF/сут (0,000175 мгF/мл), 4,0 (0,000200 мгF/мл), 6 мгF/сут (0,000300 мгF/мл). Контролем служила популяция инфузорий, культивируемая в среде без добавления фторида.

Хронический эксперимент проводили в условиях, соответствующих фторнагрузке человека от 0,5 до 6,0 мгF/сут, в течение жизни одного поколения инфузорий. Состояние отдельных особей и общую численность популяции регистрировали на 24, 48, 72 и 96 часах развития популяций, соответствующих основным фазам развития популяции инфузорий: 1) лаг-фаза - фаза медленного прироста (0-24 часа); 2) логарифмическая фаза – фаза быстрого роста популяции (24-48-72 часа); 3) фаза замедленного роста (72-96 часов); 4) стационарное состояние [2].

Для проведения пролонгированного эксперимента в условиях, соответствующих фторнагрузке человека от 0,5 до 4,0 мгF/сут, популяции последовательно пересеивались в свежие питательные среды на протяжении семи жизненных циклов (аналог семи поколений теплокровных животных). Показатели развития популяции оценивались в интервалах, соответствующих логарифмической фазе ее роста (144-й час, 192-й час, 240-й час, 288-й час).

Для первого и седьмого жизненного циклов рассчитаны интегральные показатели, отражающие влияние фторидов на численность популяции в сроки контрольных замеров - коэффициент адаптогенности Кад и резерв адаптации Рад:

$$Kad_{24-96} = \frac{N_{c-24} + N_{c-48} + N_{c-72} + N_{c-96}}{N_{k-24} + N_{k-48} + N_{k-72} + N_{k-96}} \quad Kad_{312-384} = \frac{N_{c-312} + N_{c-336} + N_{c-360} + N_{c-384}}{N_{k-312} + N_{k-336} + N_{k-360} + N_{k-384}}$$

$$Rad = \frac{Kad_{112-144}}{Kad_{24-96}} \quad \text{или} \quad Rad = \frac{N_{c-312} + N_{c-336} + N_{c-360} + N_{c-384}}{N_{c-24} + N_{c-48} + N_{c-72} + N_{c-96}}$$

где N_c – число организмов в опыте, N_k – число организмов в контроле.

В ходе экспериментов осуществляли исследования мембранотропной, тератогенной, мутагенной активности фторид-иона. Пересевы популяций, претерпевших пролонгированное воздействие исследуемых концентраций фтора, в среду культивирования без фтора и в среду, содержащую фтор в токсичной

концентрации ЛД50 (5,93 мг/мл), послужили для выяснения характера адаптационных изменений популяций инфузорий (генотипического или фенотипического) и, соответственно, для изучения мутагенной активности длительно потребляемых исследуемых доз фторидов.

Результаты и обсуждение.

На рисунке 1 обобщены данные об особенностях роста первого поколения популяций, культивируемых в средах с различной концентрацией фторидов.

При концентрациях фторида 0,000025 мгF/мл и 0,00005 мгF/мл, соответствующих фторнагрузке человека 0,5 и 1,0 мгF/сутки, динамика роста популяции практически не отличалась от контроля: фазы роста не были смещены, колебания численности популяции в фиксированные моменты подсчета не превышали 10%.

При возрастании концентрации фторида нагрузки в пределах от 0,000075 мгF/мл до 0,000145 мгF/мл (аналог фторнагрузки человека от 1,5 до 2,9 мгF/сутки) отклонения численности популяции от контрольного уровня становились более значительными, достигая 15%. Динамика фаз развития популяции соответствовала контролю, но совокупная продуктивность популяции снижалась.

В средах, содержащих от 0,000175 мгF/мл до 0,000300 мгF/мл, что соответствует фторнагрузке человека в диапазоне от 3,5 до 6 мгF/сутки, изменялись не только численность популяции (при нагрузке 3,5 мгF/сутки - на 20%, при нагрузке 4 и 6 мгF/сутки - на 50 и 24% соответственно), но и динамика фаз ее развития: во всех случаях популяция раньше достигала пика численности, а при нагрузке, соответствующей в 6 мгF/сутки, наблюдался овершют, после которого наступало преждевременное угнетение роста популяции.

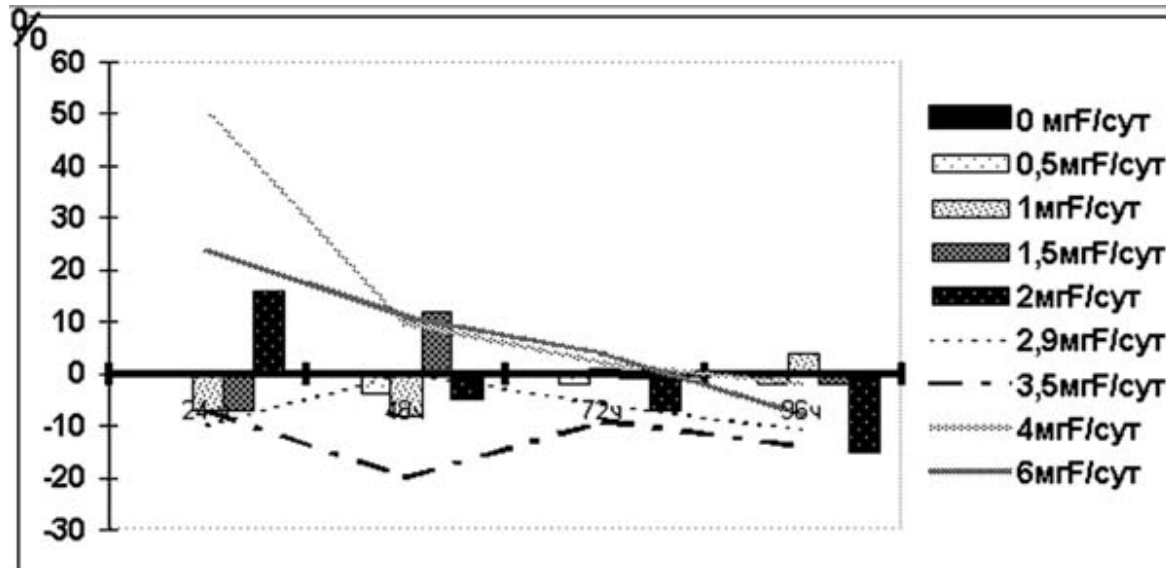


Рис. 1. Изменения динамики развития первого поколения популяций инфузорий *Tetrahymena pyriformis* в условиях, соответствующих фторнагрузке взрослого человека в диапазоне от 0 до 6 мгF/сутки.

В хроническом эксперименте изучены мембранотропные эффекты фторида. Определено, что устойчивость инфузорий к кислоте снижалась, начиная с концентрации фторида в среде, соответствующей фторнагрузке человека 2,9 мгF/сутки (показатель кислотной резистентности изменялся от 1,0 до 0,9), сохранялась

на этом уровне до концентрации, соответствующей 4,0 мг F/сутки, а при концентрации, соответствующей 6,0 мг F/сутки, снижалась до 0,8.

В среде культивирования, содержащей фториды в концентрациях, соответствующих фторнагрузке человека 4,0 и 6,0 мг F/сутки, в фазе замедленного роста зарегистрированы уродливые формы инфузорий, численность которых составила, соответственно, 14 и 25% объема популяций. В среде культивирования с максимальной из исследованных концентрацией фторида обнаружены единичные мертвые особи.

В логарифмической фазе седьмого жизненного цикла популяций инфузорий имели место те же тенденции, что и в течение первого жизненного цикла: уровень отклонений численности популяций от контроля нарастал по мере увеличения концентрации фторидов в питательной среде (см. рис. 2). Так, в условиях, соответствующих нагрузке человека не более 1.5 мг F/сутки, колебания численности популяций не превышали 15 % от контрольных показателей, при увеличении нагрузки до уровней, соответствующих фторнагрузке человека 2,9 и 4,0 мгF/сутки, уровни отклонений составили, соответственно, 18 и 21%.

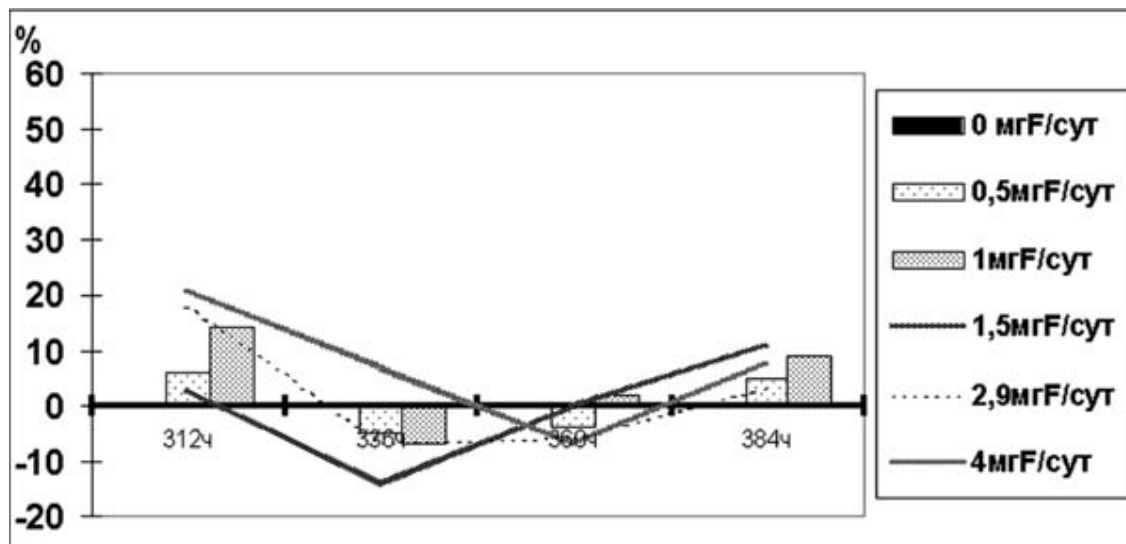


Рис 2. Изменения динамики развития популяций инфузорий *Tetrahymena pyriformis* в течение седьмого жизненного цикла в условиях, соответствующих фторнагрузке взрослого человека в диапазоне от 0 до 4 мгF/сутки.

В таблице приведены коэффициенты адаптивности, рассчитаны для первого и седьмого жизненного цикла популяций инфузорий, выращенных в различных условиях. В первом поколении тенденции снижения Кад при повышении концентрации фторида выражены гораздо ярче (отличия достигают 14% от Кад контрольной популяции $p < 0,01$), чем в седьмом (различия не превышают 4% и не являются достоверными). О том, что инфузории со временем адаптируются к фторнагрузке, говорят и показатели резерва адаптации, который во всех случаях превышает единицу (см. табл.).

После пересева инфузорий, семь поколений популяций которых жили в присутствии фторидов, в среды без фтора наблюдались некоторые изменения в активности популяций (см. таблицу.), однако коэффициенты адаптивности отличались от контрольных показателей не более чем 10% (при этом максимальную

активность проявила популяция, выращенная в условиях, соответствующих фторнагрузке человека 1,0 мг F/сутки). При переносе популяций, произраставших в опытных фторсодержащих средах, в среду, содержащую фтор в токсичной концентрации (ЛД 50 = 5,93 мгF/мл), инфузории погибли сразу, не приступая к размножению. Эти данные свидетельствуют о фенотипическом характере изменений в популяциях инфузорий, зарегистрированных в ходе эксперимента.

Таблица

Влияние фтора на адаптационный потенциал популяции *Tetrahymena pyriformis*

Фтор, мг/мл, мг/сутки	Коэффициент адаптогенности 24-96 часов	Коэффициент адаптогенности 312-384 часа	Резерв адаптации	Кадр ₃₁₂₋₃₈₄ после пересева в среду без фтора
Контроль	1,00±0,015	1,00±0,015	1,00±0,015	1,00±0,015
0,000025; 0,5	0,97±0,006	1,00±0,015	1,03±0,015	0,94±0,009
0,00005; 1,0	1,00±0,023	1,02±0,004	1,02±0,004	1,09±0,030
0,000075; 1,5	0,86±0,012	1,00±0,015	1,16±0,017	0,92±0,010
0,000145; 2,9	0,96±0,035	0,98±0,019	1,02±0,018	0,90±0,020
0,00020; 4,0	0,94±0,039	1,04±0,012	1,11±0,015	1,01±0,009

Заключение.

Обнаруженные в ходе эксперимента дозо-зависимые изменения в развитии популяций и состояния отдельных особей инфузорий дают основания расценивать уровень фторнагрузки, соответствующий суточному поступлению в организм человека 2,9 мгF/сутки, как верхний предел, при котором отрицательные биологические эффекты фторид-иона не являются значительными. Данные пролонгированного эксперимента позволяют сделать заключение об отсутствии мутагенного эффекта фторнагрузки, соответствующей пожизненному поступлению фторида в организм человека в количестве мгF/сутки от 0,5 до 4,0 мгF/сутки.

Литература.

1. Бергманн К.Е., Бергманн Р.Л. Фторирование соли и здоровье человека // Новое в стоматологии. – 1994. - №2. – С.30-31.
2. Богдан А.С. Комплексная биологическая оценка объектов природного и искусственного происхождения на *Tetrahymena pyriformis*: Метод. рекомендации. Минск, 1996. – 25 с.
3. Габович Р.Д., Минх А.А. Гигиенические проблемы фторирования питьевой воды. – М.: Медицина, 1979. – 200 с.
4. Мельниченко Э.М., Терехова Т.Н. Попруженко Т.В. Системное применение фторидов в профилактике кариеса зубов. – Минск, 1999. – 155 с.
5. Нормы физиологических потребностей в пищевых веществах и энергии для различных групп населения СССР. – М. – 1991 г. – 156 с.
6. Фториды и гигиена полости рта. Серия технических докладов ВОЗ // Стоматология. – 1995. - №5. – С.30 – 42.
7. Li – Y, Liang C.K., Katz B.P., Brisendine E.P. Long-term exposure to fluoride in drinking water and sister chromatide exchange frequency in human blood lymphocytes // Journal of Dental Research. - 1995. –Vol.74. - №8. - P. 1468 – 1474.
8. Riordan P.J. Fluoride supplements for young children: an analysis of the literature focusing on benefits and risks // Community Dentistry and Oral Epidemiology - 1999 – Vol. 27– P. 72-83.

9. Stefen K.W. Fluoride prospects for the millennium – community and individual patient aspects // Acta Odontologica Scandinavica. – 1999. - Vol.57. - №6. – P.352 – 355.
10. Whitford G.M. The physiological and toxicological characteristics of fluoride. – Journal of Dental Research // 1990 – Vol. 69 - Spec № - P. 539 – 549.