

## **Titán-dioxid nanorészecskék szubakut neurotoxicitásának vizsgálata patkány modellben**

### **Investigation of subacute neurotoxicity of titanium-dioxide nanoparticles in rat model**

**Horváth Tamara<sup>1</sup>, Szabó Andrea<sup>1</sup>, Lukács Anita<sup>1</sup>, Oszlanczi Gábor<sup>1</sup>, Kozma Gábor<sup>2</sup>,  
Kovács Dávid<sup>3</sup>, Kálomista Ildikó<sup>4</sup>, Vezér Tünde<sup>1</sup>, Papp András<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Népegészségtani Intézet, Szeged*

<sup>2</sup>*Szegedi Tudományegyetem Alkalmazott és Környezeti Kémiai Tanszék, Szeged*

<sup>3</sup>*Szegedi Tudományegyetem TTIK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék, Szeged*

<sup>4</sup>*Szegedi Tudományegyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, Szeged*

**HORVÁTH TAMARA**

SZTE ÁOK Népegészségtani Intézet

6720 Szeged, Dóm tér 10.

Telefon: 62 545-119, Fax: 62 545-120

E-mail: horvath.tamara@med.u-szeged.hu

**Összefoglalás:** A titán-dioxid nanorészecskéket (TiO<sub>2</sub> NP-okat) már számos iparág alkalmazza, így fellelhetők különböző fogyasztási cikkekben, beleértve az élelmiszereket és a gyógyszereket. Széles körű alkalmazása egy esetleges foglalkozási, környezeti és/vagy szándékos emberi expozíciót és egészségügyi kockázatot is felvet. A nanorészecskék biológiai, illetve egészségügyi hatása jelenleg is intenzíven kutatott, de ezidáig nem teljesen tisztázott terület. A nanoméretű titán-dioxid részecskék idegrendszerre gyakorolt hatása szinte teljesen feltáratlan, azok potenciális neurotoxikus hatására vonatkozóan mindössze néhány adat áll rendelkezésre az irodalomban. A TiO<sub>2</sub> NP-ok lehetséges idegrendszeri hatása a nanorészecskék szervezetben belüli mozgékonyasága illetve a nano-TiO<sub>2</sub> felületi reaktivitása miatt feltételezhető. Jelen munkában a patkányokat intratracheálisan kezeltük TiO<sub>2</sub> NP-okkal és a funkcionális idegrendszeri változásokat elektrofiziológiai és kognitív magatartás módszerekkel vizsgáltuk. Az eredmények bizonyos mértékig alátámasztották a nano-TiO<sub>2</sub> neurotoxicitását, azonban hangsúlyozni kell, hogy ennek megerősítésére további vizsgálatok szükségesek.

**Kulcsszavak:** patkány, titán-dioxid nanorészecskék, neurotoxicitás, elektrofiziológia, kognitív magatartás, oxidatív stressz

**Abstract:** Titanium dioxide nanoparticles (TiO<sub>2</sub> NPs) have numerous industrial applications and appear in various consumers' goods including foods and medicines. This widespread application raises the question of a potential occupational, environmental and/or intentional human exposure and health hazard. The biological effects of nanoparticles

and their health consequences are currently intensively studied, but incompletely understood so far. The nervous system effects of nano-sized titanium-dioxide particles is almost completely unexplored, just a few data are available in the literature indicating their potential neurotoxicity. Potential nervous system effects of TiO<sub>2</sub> NPs are suggested by the motility of nanoparticles within the organism and the surface reactivity of nano-TiO<sub>2</sub>. In the present work, rats were intratracheally exposed to TiO<sub>2</sub> NPs and the functional changes in the nervous system were examined using electrophysiological and cognitive behavioural methods. The results supported the neurotoxicity of nano-titanium to some extent but also underlined the need for further investigations to neurotoxicity verification.

**Keywords:** rat, titanium dioxide nanoparticles, neurotoxicity electrophysiology, cognitive behavior, oxidative stress

## Bevezetés

A nanorészecskék – 100 nm-nél nem nagyobb átmérővel jellemezhető partikulumok, azaz nanopartikulumok (NP-ok) – és nanoanyagok kutatása és alkalmazása napjainkban rohamosan fejlődő terület. A nanorészecskéket egyre nagyobb mértékben használják fel az egészségügyben, mezőgazdaságban, energiatermelésben, illetve a környezetvédelemben [1; 2]. Ennek során elkerülhetetlen, sőt egyre gyakoribb az előállított NP-okkal és azokat tartalmazó termékekkel történő humán expozíció. Mivel a NP-ok fizikai és kémiai, illetve ebből adódóan biológiai tulajdonságai nagyon eltérőek lehetnek más anyagokhoz, akár a nanoszemcsét alkotó vegyület megszokott halmazállapotaihoz képest [3], az élő szervezettel való különféle kölcsönhatásaik, így toxikológiai tulajdonságaik is csak részlegesen ismertek, ami egy újszerű egészségügyi kockázat jelenlétére [4] és ennél fogva az egészségvédelmi intézkedéseket megalapozó kutatások szükségességére [5] mutat rá.

A titán-dioxidnak több ismert ipari alkalmazása van, legjelentősebb a fehér pigmentként való használat – nemcsak festékekben, hanem élelmiszer- és gyógyszeripari színező és bevonó anyagokban is [6]. Fogkrémek, bőrápolási termékek, és különösen a magas fényvédő faktorú kozmetikai (napvédő) szerek ugyancsak gyakran tartalmaznak nano-TiO<sub>2</sub>-ot [7]. A TiO<sub>2</sub> anatáz formája fotokatalitikus tulajdonsággal rendelkezik, ezért alkalmazzák adalékanyagként pl. „öntisztuló” festékek és építőanyagok előállításánál [8].

A TiO<sub>2</sub> NP-ok széles körben és egyre növekvő mértékben történő alkalmazása a fentiek értelmében felveti az egészségügyi kockázat fennállásának és mértékének kérdését; az irodalomban azonban ellentmondásos adatok találhatóak mind a nano-TiO<sub>2</sub> dermális és pulmonális abszorpciója, mind pedig biológiai hatásai vonatkozásában. A részecskék krónikus (akár több mint 20 évig tartó) belégzésével összefüggő tüdőkárosodás és -tumor nem igazolódott TiO<sub>2</sub>-pigment expozíciónak kitett dolgozók körében [9], illetve ilyen jellegű aeroszollal kezelt patkányok esetében [10] sem. Azonban az, hogy a NP-ok fizikokémiai (méretbeli és felületi) tulajdonságaiknál fogva képesek a vér-agy gáton áthatolni [5] illetve élő szervezetbe kerülve oxidatív stresszt kelteni [3], együttesen felveti a központi idegrendszeri (KIR) károsodás kérdését. A nano-TiO<sub>2</sub> említett képességei az irodalomban bőségesen dokumentáltak [6; 7]. Neurológiai tünetekről számoltak be TiO<sub>2</sub>-pigmenttel exponált embereknél [11], illetve oxidatív stresszt generáló hatás és agyi károsítás együttes fennállását igazolták egérben [12; 13].

Jelen munkában patkányokat kezeltünk  $\text{TiO}_2$  NP-okkal, intratracheális bejuttatással. Vizsgáltuk a kezelt állatok testtömeg-gyarapodását, a Ti-tartalom változását különböző szervekben, továbbá az idegrendszer funkcionális elváltozásait elektrofiziológiai, illetve kognitív magatartás módszerekkel. További kísérletek lehetőségét is figyelembe véve igyekeztünk megállapítani a megfelelő kezelési dózistartományt, illetve azt, hogy más munkakörnyezeti szennyező (pl. Mn- illetve Cd-tartalmú) NP-okkal végzett állatkísérletekben [14; 15] már alkalmazott klasszikus metodológiai megközelítések kellően érzékeny markerek-e a nano- $\text{TiO}_2$  általános és magasabb rendű idegrendszeri toxicitásának vizsgálatára.

### **Anyagok és módszerek**

A 7 hetes kísérlet során 50 db  $170 \pm 20$ g induló súlyú, SPF higiénés státuszú, fiatal felnőtt hím (CrI:WI BR) Wistar patkányt használtunk (Toxi Coop Kft, Magyarország). A konvencionális állatházba szállítást követően a 7 napos karantén során az állatok véletlenszerűen, hármásával kerültek elhelyezésre  $25 \times 36 \times 18$ cm-es polipropilén ketrecben, korlátlan (SSniff R/M-Z+H, Toxi Coop Kft) rágszalótáp- és ivóvíz-fogyasztással. A karantén végén a patkányokat spontán felfedező aktivitásuk alapján 5 csoportba soroltuk (10 állat/csoport), majd 2 napig akklimatizáltuk (**1. táblázat**). A csoportonkénti elemszám power analízis alapján ( $p=0,8$  esetén) elegendően nagy volt. Az állatok azonosítására csoportonként eltérő színű fark számkód jelölést használtunk. A patkányok az akklimatizáció kezdetétől a kísérlet végéig mennyiségileg korlátozott ( $20-30$ g/állat/nap) tápot fogyasztottak. A környezetgazdagítást csoportos állattartással (3, majd 2 állat/doboz) valósítottuk meg. A kísérlet alatt standard állatházi körülményeket biztosítottunk ( $22 \pm 3^\circ\text{C}$ , 30-70% páratartalom, 12 órás fény/sötét ciklus). A vizsgálatokat a hatályos GLP elveknek és követelményeknek megfelelően, illetve érvényes (XXI./153/2013. sz.) etikai bizottsági engedély birtokában folytattuk le.

Az akklimatizációt követő 28 napos kezelés (5 kezelési nap/hét) során az 5 közül 3 csoportnak ( $3 \times 10$  állat) naponta 1 alkalommal 8-10 óra között, csoportonként különböző (1, 3 illetve  $10$  mg/ttkg) dózisú ( $<50$  nm átmérőjű, gömbszerű) nano- $\text{TiO}_2$ -t tartalmazó foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldat szuszpenziót instilláltunk intratracheálisan, rövid dietil-éteres bódításban [14]. (A nanoanyagot az SZTE Alkalmazott és Környezeti Kémiai Tanszéken állították elő.) A stabilitás céljából 1%-os hidroxietil-cellulóz (HEC) vivőanyagot is tartalmazó szuszpenziót a beadások előtt szonikáltuk. A nano- $\text{TiO}_2$  szuszpenzió beadási térfogata  $1$  ml/ttkg volt. A kezeléseket azonos (növekvő farokkód szerinti) sorrendben,

egyesevel, elszívófülke alatt, az állattartó helyiségtől eltérő területen végeztük. A vivőanyag (VK) és a kezeletlen (K) kontrollok közül csak az előbbi csoporttal végeztünk dietil-éteres bódítást és vivőanyag instillációt, míg az utóbbi csoport semmilyen beavatkozáson sem esett át (**1. táblázat**). Az állatok testtömegét naponta mértük, mely alapját képezte a napi kezelési térfogatok, továbbá a csoportonkénti testtömeg átlagok, a hetenkénti változások és a súlygyarapodási ütem meghatározásának.

**1. Táblázat** Vizsgálati csoportok, TiO<sub>2</sub> NP kezelési dózisok és térfogatok.

**Table 1** Treatment groups. Doses of TiO<sub>2</sub> NPs and application volumes.

<b>Csoportok Groups</b>	<b>Kód Code</b>	<b>Kézelés (anyag, dózis, térfogat) Treatment (substance, dose, volume)</b>
Kezeletlen kontroll Control	K C	- -
Vivőanyag kontroll Vehicle Control	VK VC	HEC, 1%, 1 ml/ttkg HEC, 1%, 1 ml/bw
Kis dózis nano-TiO <sub>2</sub> szuszpenzió Low dose	KD LD	TiO <sub>2</sub> NP, 1 mg/ttkg, 1 ml/ttkg TiO <sub>2</sub> NP, 1 mg/bw, 1 ml/bw
Közepes dózis nano-TiO <sub>2</sub> szuszpenzió Medium dose	KpD MD	TiO <sub>2</sub> NP, 3 mg/ttkg, 1 ml/ttkg TiO <sub>2</sub> NP, 3 mg/bw, 1 ml/bw
Nagy dózis nano-TiO <sub>2</sub> szuszpenzió High dose	ND HD	TiO <sub>2</sub> NP, 10 mg/ttkg, 1 ml/ttkg TiO <sub>2</sub> NP, 10 mg/bw, 1 ml/bw

A kísérlet során a patkányok spontán felderítő aktivitását két alkalommal – a karantén és a 28 napos kezelés végén – open field (OF) készülékben (Conducta 1.0 Mozgás- és Viselkedésvértékelő Program, Experimetria Kft., Magyarország), állatonként 10 percig teszteltük. A vizsgálatot 8-14 óra között az állattartó szobától független 40 dB háttérzajú, 15-25 lux megvilágítású helyiségben, 20 perces környezeti adaptációt követően végeztük. Az állatok műszerbe helyezése először a kontroll (K, VK), majd kezelt (KD, KpD és ND) csoportokban növekvő farokkód szerint történt. A készülék a platótól különböző magasságokban körbefutó és egymástól szabályos távolságokra elhelyezkedő infravörös fénykapu-sorok segítségével detektálta az egyes állatok mozgását. A 16 féle mozgékonyági paraméter (pl. befutott távolság, helyváltogatás, lokális aktivitás és mozdulatlanság eseményszáma és összes ideje) alkotta viselkedési mintázat az OF (48x48 cm) teljes alapterületére vagy annak kitüntetett (pl. 12x12 cm-es centrális, fal melletti, sarok) zónáira vonatkoztatva, továbbá percenkénti felbontásban is tesztelhető. A szorongásra az 1. percben mért viselkedés mintázatból, vagy a centrális/sarok illetve centrális/fal melletti zónában mért paraméter hányadosokból lehet következtetni. Az állatonkénti mérések végén dokumentáltuk az emocionális státuszra utaló defekáció bólus számot is. A készüléket minden mérés után

semleges mosószerrel, majd száraz papír törölkendővel áttöröltük. Az OF vizsgálat után a patkányok visszakerültek az állattartó szobába.

A 28 napos kezelési periódus végén elektrofiziológiai regisztrálást végeztünk. Az állatok ehhez szükséges (növekvő farokkód szerinti) preparálását ip. uretános (1000 mg/ttkg, Reanal Kft.) altatásban végeztük. Az anesztézia hatékonyságát a hátsó láb illetve a farok elhárító reflexével ellenőriztük. A sztereotaxiás készülékben a fej rögzítése után feltártuk a bal agyféltekét. A dura matert – a kiszáradás megakadályozására – vékony réteg vazelinnel fedtük be. Fél óra pihenést követően ezüst elvezető elektródát helyeztünk a primer szomatoszenzoros (SS), vizuális (VIS) és auditív (AUD) kérgi mezőre. Először 6 percnyi spontán aktivitást (elektrokortikogramot; EKoG) rögzítettünk, ezt követően szenzoros kiváltott potenciálokat (EP) regisztráltunk. Szomatoszenzoros ingerként a patkány ellenoldali bajuszmezőjébe szúrt tűpáron keresztül gyenge elektromos ütések (3-4 V; 0,05 ms) alkalmaztunk 1, 2 és 10 Hz frekvenciával. A vizuális ingerlés nagy fényerejű fehér LED felvillanásaival történt (0,2 ms; 1 Hz). Az akusztikus ingerek ("click"; 70 dB; 1 Hz) a hallójáratba illeszkedő sztereotaxiás rögzítő rúd furatán át jutottak az állat fülébe. Mindhárom ingerlési modalitásban 50-50 ingert alkalmaztunk. A farokidegben az összetett idegi akciós potenciált a faroktőnél beszúrt tűpáron adott elektromos ingerrel (4-5 V; 0,05 ms; 1 Hz) váltottuk ki, és attól 50 mm-re disztálisan beszúrt másik tűpár segítségével vezettük el, 10 ingerből álló sorozattal. A regisztrátumok tárolása és részben automatizált értékelése számítógéppel, a NEUROSYS 1.11 szoftver (Experimetria Kft., Magyarország) segítségével történt. Az EKoG felvételből meghatároztuk a különböző hullámsávokra (delta, theta, alfa, beta1 és beta2) eső relatív teljesítményt. A kérgi EP-kból felvett 50-es sorozatot átlagoltuk, majd meghatároztuk a válaszok latenciáját és időtartamát. A perifériás ideg vezetési sebességének meghatározása az ingerületi hullám megjelenésének latenciája, valamint az ingerlő és elvezető tűpár közötti 50 mm-es távolság alapján történt. A relatív refrakter idő hosszát kettős ingerléssel, a második akciós potenciál latenciája és az ingerközi idő összefüggése alapján számítottuk ki.

Az elektrofiziológias regisztrálást követően a patkányokat ip. (2000 mg/ttkg) uretánnal kíméletesen túlaltattuk. Ezután a hasi vénából 2-3 ml heparinnal alvadásgátolt vért vettünk, majd csoportonként (véletlenszerűen kiválasztott) 3-3 állat esetében transzkardiális perfúzió (500 ml 4°C-os fiziológias sóoldat/állat) után, 7-7 állat esetében pedig anélkül nekropsziát végeztünk. Ennek során eltávolítottuk és lemértük a feltételezett célszervek – agy, tüdő, szív, máj, lép, vese, mellékvese, csecsemőmirigy – abszolút tömegét, mely alapján és a testtömeg ismeretében meghatároztuk azok (agytömegre és a testtömeg 1/100 részére vonatkoztatott)

relatív szervtömegét. Valamennyi vér- és szervmintát további feldolgozásig folyékony nitrogénben történt pillanatfagyasztás után  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

A perfundált állatok (3 patkány/csoport) feltételezett célszervei/-szövetei közül négyet (agy, tüdő, máj, vér) Ti-koncentráció meghatározás céljából kettős emésztésnek vetettük alá. Ennek során 1:1 arányban használtunk sósavat illetve salétromsavat. Először 3 ml sósavat alkalmazva másfél óráig emésztettük a szerveket  $90^{\circ}\text{C}$ -on, majd 3 ml salétromsav hozzáadása után további másfél óráig történt az emésztés. Ezt követően a kapott oldatot hidrofil  $0,45\ \mu\text{m}$ -es szűrő segítségével leszűrtük, végül kiegészítettük desztillált vízzel 100 ml-re. Az emésztés után a szövetek Ti-koncentrációja ICP-MS készülékkel került meghatározásra (a SZTE Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken).

A nem perfundált állatok (7 patkány/csoport) közül csoportonként (véletlenszerűen kiválasztott) 3-3 patkány teljes vér-, agy-, tüdő-, máj- és nyirokcsomó-mintáiból az oxidatív stressz jellemzésére meghatároztuk a lipidperoxidáció mértékét (TBARS-reakció), a kataláz-aktivitást, és a redukált glutation- (GSH-) szintet. A mérések az SZTE TTIK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszéken folytak az alábbiak szerint:

A lipidperoxidáció méréshez a szervmintákat fiziológiás sóoldatban homogenizáltuk, majd Serbinova és mtsai [16] által kidolgozott módszerrel TBARS-reakciót végeztünk. Ennek során a képződött malondialdehid (MDA) koncentrációját  $532\ \text{nm}$ -en, Synergy HTX mikroplate olvasóval határoztuk meg és a kapott értékeket  $1\ \text{mg}$  szövetre normalizálva fejeztük ki ( $\mu\text{M}$  MDA/mg szövet). A vérminták esetében – hemolízist követően – fehérjekoncentráció meghatározást végeztünk Bradford-módszerrel, majd a TBARS-reakciót követően a lipidperoxidáció mértékét  $\mu\text{M}$  MDA/mg fehérje mértékegységben határoztuk meg.

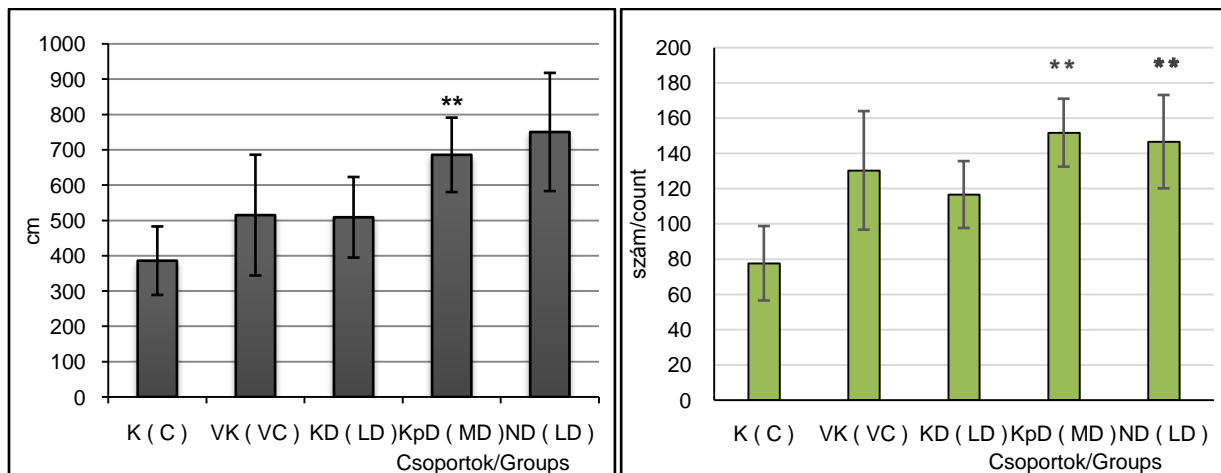
A minták kataláz-aktivitásának meghatározásához a centrifugátumok felüliszóját PBS-ben hígítottuk, majd 1%-os  $\text{H}_2\text{O}_2$  hozzáadása után  $240\ \text{nm}$ -en regisztráltuk az abszorbancia változását. A kataláz-aktivitást Bergmayer egységben fejeztük ki ( $1\ \text{BE} = 1\ \text{g}\ \text{H}_2\text{O}_2$  lebontása percenként,  $25^{\circ}\text{C}$ -on).

A szerv- és vérminták GSH-szint méréséhez a szövet-homogenizátumokat 5%-os TCA oldattal hígítottuk, majd a képződött csapadékot centrifugálással ( $3000\ \text{g}$ , 15 perc,  $4^{\circ}\text{C}$ ) távolítottuk el. A felüliszókból, valamint  $1\ \text{mM}$  DTNB- és TRIS-oldatból azonos térfogatokat pipettáztunk  $96$ -lyukú lemezre és az oldatok abszorbanciáját  $405\ \text{nm}$ -en olvastuk le. A minták glutation-koncentrációját kalibráló egyenes segítségével határoztuk meg.

A vizsgálati eredmények normál eloszlását Kolmogorov-Szmirnov teszttel ellenőriztük. Normál eloszlás esetén parametrikus egyutas ANOVA fő- és post hoc Tukey tesztet, nem normál eloszlás esetén Kruskal-Wallis fő- és post hoc Mann-Whitney U analízist végeztünk. A statisztikai értékelés SPSS 22.0 verziójú (IBM Corporation, USA) programmal történt. A csoportok közti eltéréseket  $p < 0,05$  esetén tekintettük szignifikánsnak.

## Eredmények

A kezelési periódust követően a csoportok open field (OF) készülék teljes (48x48 cm) alapterületén mért 10 perces spontán (lokális, horizontális és vertikális irányú) felfedező aktivitása nem mutatott jelentős eltérést egymástól. Ezért az állatok viselkedés mintázatát zonálisan és percenkénti bontásban is elemeztük. A műszer alapterületének 4x4-es (12x12 cm-es centrális, fal melletti és sarok zónákra történő) felosztása alapján a KpD csoport 10 perces nekiirramodás száma a centrális zónában szignifikáns csökkenést, míg motilitása (futástávolsága és horizontális aktivitása) a sarok zónákban szignifikáns növekedést mutatott a kezeletlen kontrollokhoz képest (**1. ábra**).

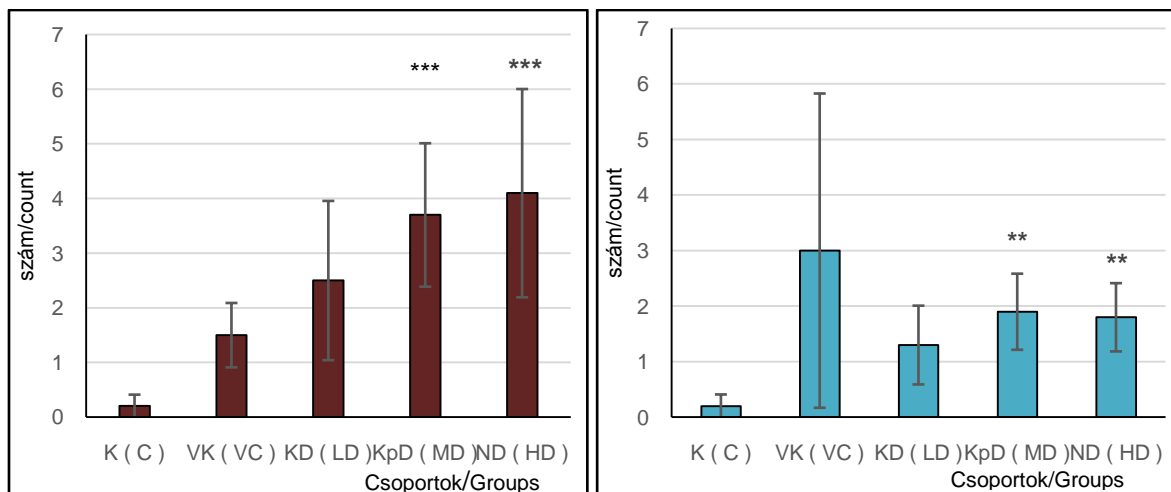


**1 ábra** A csoportok OF sarok zónákban mutatott 10 perces futástávolság (cm, balra) és horizontális aktivitása (vízszintes irányú fény-megszakítások száma, jobbra) a kezelés végén. Átlag±szórás. n=10. Jelmagyarázat: \*\*:  $p < 0,01$  vs. K csoport.

**Figure 1** Run length (cm, left graph), and horizontal activity (number of horizontal light beam interruptions, right graph) in 10 min in the corner zones of the OF at the end of treatment. Mean±SD, n=10. \*\*:  $p < 0.01$  vs. C.

A csoportok OF teljes alapterületén, továbbá a centrális és fal melletti zónákban mutatott 1. perces mozgásmintázata nem tért el jelentősen egymástól. Azonban a KpD és ND csoportok sarok zónában mutatott 1. perces spontán vertikális aktivitása és ágaskodás száma szignifikánsan magasabb volt a kezeletlen kontrollokénál (**2. ábra**).

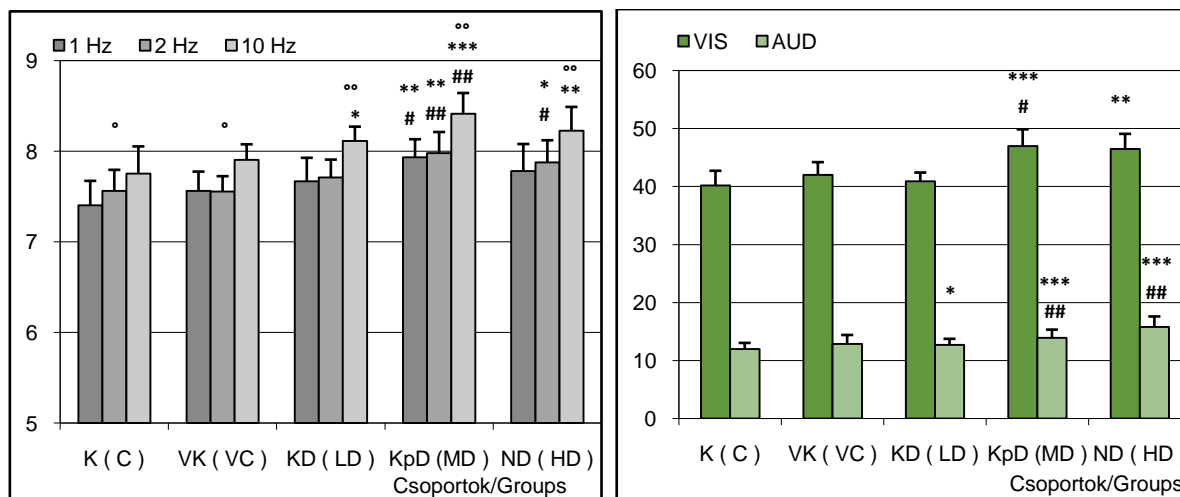




**2. ábra** A csoportok OF sarok zónában mutatott 1. perces vertikális aktivitása (függőleges irányú fény-megszakítások száma, balra) és ágaskodás száma (jobbra) a kezelés végén Átlag±szórás. n=10. Jelmagyarázat: \*\*, \*\*\*: p<0,01; <0,001 vs. K csoport

**Figure 2** Vertical activity (number of vertical light beam interruptions, left graph) and number of rearings (right graph) in the 1<sup>st</sup> minute in the corner zones of the OF, at the end of treatment. Mean±SD, n=10. \*\*, \*\*\*: p<0.01; 0.001 vs. C.

A 10 perc alatti centrális és sarok zóna lokális aktivitások aránya a KpD csoportban szignifikánsan csökkent a K csoporthoz képest (p=0,040), míg a csoportok 1. perces centrális/sarok zóna lokális aktivitási aránya nem tért el lényegesen egymástól. A kezelt és a kontroll állatok emocionális állapotra utaló defekáció száma között sem volt jelentős eltérés.



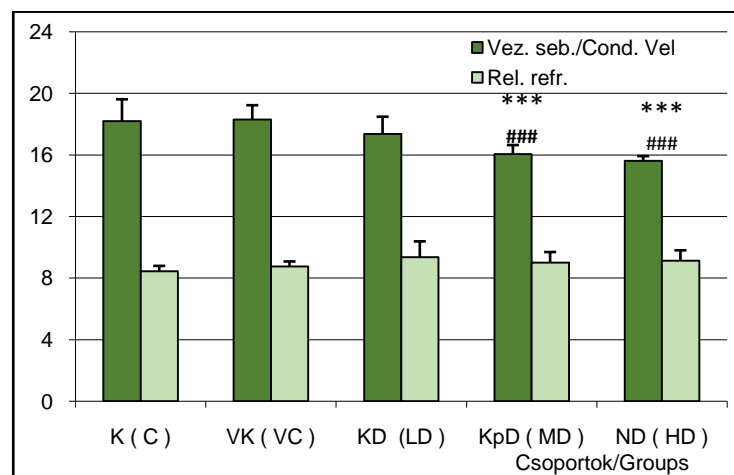
**3. ábra** SS kiváltott potenciál (EP) latenciája (különböző frekvenciákon, balra) és a VIS, AUD EP latenciája (jobbra) a kezelés végén a csoportokban. Átlag+szórás, n=10 állat/csoport. Jelmagyarázat: \*, \*\*, \*\*\*: p<0,05; 0,01; 0,001 vs. K csoport; #, ##, ###: p<0,05; 0,01 vs. VK csoport; °, °°, °°°: p<0,05; 0,01; 0,001 ugyanazon csoporton belül az 1 Hz-es ingerléshez kaptothoz képest.

**Figure 3** Latency of the SS EP (at various frequencies, left graph) and the VIS and AUD EP (right graph) at the end of treatment. Mean+SD, n=10/group. \*, \*\*, \*\*\*: p<0.05; 0.01; 0.001 vs. C. #, ##, ###: p<0.05; 0.01 vs. VC. °, °°, °°°: p<0.05; 0.01; 0.001 vs. latency with 1 Hz stimulation within the same group.

Az elektrofiziológiai paraméterek közül az EKG spektrum a magasabb frekvencia-tartomány felé tolódott a kezelt csoportokban, de a változás nem volt szignifikáns. A kiváltott potenciálok (EP) latencia ideje azonban szignifikánsan megnyúlt (**3. ábra**). A K és VK csoport között nem volt jelentős eltérés, azonban a kezelt csoportokban az EP-ok latenciája szignifikánsan fokozódott mindkét kontrollhoz képest.

Az SS EP latencia ingerlési frekvenciától függő fokozódása szintén nagyobb mértékű volt a kezelt csoportokban (**3. ábra**, balra).

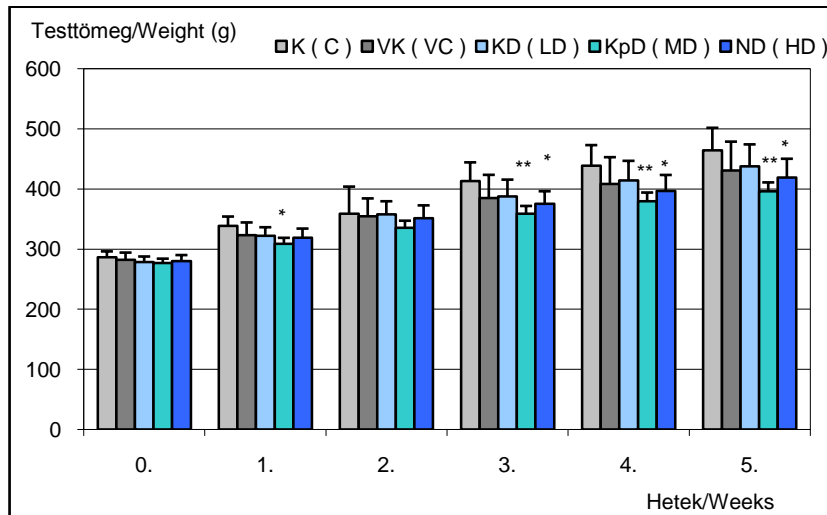
A farokideg vezetési sebessége a kezelt csoportokban szignifikánsan csökkent (**4. ábra**), ezzel párhuzamosan a relatív refrakter idő megnyúlt, bár ez nem érte el a szignifikancia szintjét.



**4.ábra** A csoportok farokideg vezetési sebessége (m/s) és relatív refrakter ideje (ms) a kísérlet végén. Átlag+szórás, n=10 állat/csoport. Jelmagyarázat: \*\*\*: p<0,001 vs. K csoport; ####: p<0,001 vs. VK csoport

**Figure 4** Conduction velocity (m/s) and relative refractory period (ms) of the tail nerve at the end of treatment. Mean+SD, n=10/group. \*\*\*: p<0.001 vs. C. ####: p<0.001 vs. VC.

Az életkor előrehaladtával az állatok átlagos testtömege valamennyi csoportban emelkedő tendenciát mutatott a karantén idején (7 nap) korlátlan, valamint az akklimatizáció és kezelési periódus (kísérlet 1-5. hét) alatti korlátozott tápetetés mellett. A kísérlet 3-5. hetében a testtömeg átlagok a nano-TiO<sub>2</sub>-kezelt KpD és ND csoportban a kezeletlen kontrollokénál szignifikánsan kisebbnek bizonyultak. A szignifikáns testtömeg-csökkenés korábban (a kezelés 1. hetében) jelentkezett és jelentősebb mértékűnek bizonyult a KpD, mint a ND csoportnál (**5. ábra**).



**5. ábra** A csoportok testtömege az egyes kísérleti hetek végén (0. hét: akklimatizáció). Átlag±szórás, n=10; Jelmagyarázat: \*, \*\* p<0,05; 0,01 vs. K csoport

**Figure 5** Body mass in the treatment groups at the end of the experimental weeks (0<sup>th</sup> week: acclimation). Mean±SD, n=10. \*, \*\*: p<0.05; 0.01 vs. C.

A kísérlet 0-5. hete közötti (kumulatív) átlagos testtömeg-gyarapodás mértéke ennek megfelelően szignifikánsan alacsonyabb volt a KpD és ND TiO<sub>2</sub>-NP-kezelt csoportokban a kezeletlen kontroll állatokéhoz képest (**2. táblázat**)

**2. táblázat.** A kumulatív testtömeg gyarapodás (g) a kontroll és kezelt csoportokban. Átlag±szórás, n=10. Jelmagyarázat: \*: p<0,05 vs. K csoport.

**Table 2** Cumulative body weight gain (g) in the control and treated groups. Mean±SD, n=10. \*: p<0.05 vs. C.

Csoportok/Groups	K/C	VK/VC	KD/LD	KpD/MD	ND/HD
<b>Testtömeg növekedés (g)</b> <b>Body weight gain (g)</b>	213.6±34.9	177.4±43.4	187.7±37.2	142.2±16.5*	165.2±26.6*

A 28 napos kezelési periódus során a 4x7 naponkénti kezelési szakaszokban észlelt testtömeg változási ütem alakulásában a kornak (illetve az expozíciós időnek) és a kezelési dózisoknak volt (F=16,799, p<0,000), míg a kor-dózis interakciónak nem volt (F=0,173, p=0,999) szerepe. Az átlag testtömeg növekedés értéke a KpD csoportban szignifikánsan kisebbnek bizonyult a kezeletlen kontrollhoz (F=5,006, p=0,002) és a KD (F=50,006, p=0,015) csoportéhoz képest. A 7 naponkénti testtömeg növekedési ütem a 28 napos kezelési periódus 3. és 4. (7 napos) kezelési szakaszában szignifikánsan csökkent az 1. és 2. (7 napos) kezelési szakaszokhoz viszonyítva (F=148, valamennyi esetben p<0,000).

A kezeléseket követően (a kísérlet 6. hetében) végzett boncolás során az eltávolított célszervek (agy, tüdő, szív, máj, lép, vesék, mellékvesék, csecsemőmirigy) közül a tüdő

abszolút tömege mindhárom kezelt csoportban szignifikánsan magasabbnak bizonyult a kezeletlen kontrollokhöz képest (KD-, KpD-, ND-K:  $p=0,000$ ; KpD-KD:  $p=0,000$ , ND-KD:  $p=0,002$ ). A többi szerv esetén nem tapasztaltunk eltérést a csoportok között.

A KD nano-TiO<sub>2</sub>-al kezelt csoportban a testtömeg 1/100-részére vonatkoztatott relatív agy-, tüdő- és vesetömeg, a KpD állatoknál a relatív agy- és tüdő-tömeg, míg a ND patkányok esetében a relatív vese- és tüdő-tömeg nőtt szignifikánsan a kezeletlen kontrollokhöz viszonyítva. A ND csoport relatív tüdő- és vesetömege mindkét kontroll és a KD csoporttól is szignifikánsan eltért (**3. táblázat**).

**3. táblázat** A csoportok 1/100 testtömegre vonatkoztatott relatív szervtömege a kezelés végén. Átlag±szórás, n=10. Jelmagyarázat: \*, \*\*, \*\*\*:  $p<0,05$ , 0,01, 0,001 vs. K csoport; ##:  $p<0,01$  vs. VK; °°:  $p<0,01$  vs. KD; +:  $p<0,05$  vs. KpD csoport

**Table 3** Relative organ weights (related to 1/1000 body weight) in the groups at the end of treatment. Mean±SD, n=10/group. \*, \*\*, \*\*\*:  $p<0.05$ , 0.01, 0.001 vs. C. ##:  $p<0.01$  vs. VC. °°:  $p<0.01$  vs. LD; +:  $p<0.05$  vs. MD.

Csoportok Groups	Relatív szervtömegek/Relative organ weights				
	Agy Brain	Tüdő Lung	Máj Liver	Vesék Kidneys	Mellékvesék/ Adrenals
K/C	0.443±0.03	0.303±0.02	3,221±0.32	0.584±0.02	0.015±0.00
VK/VC	0.483±0.06**	0.559±0.04***	3.153±0.21	0.632±0.09***	0.017±0.00
KD/LD	0.508±0.07***	0.565±0.09***	3.792±1.41	0.691±0.09***	0.018±0.01
KpD/MD	0.510±0.02***	0.656±0.10***##°°	3.183±0.29	0.669±0.09##°°	0.018±0.01
ND/HD	0.498±0.04	0.642±0.06***##°°	3.228±0.36	0.640±0.07*+	0.031±0.04

Az agytömegekre vonatkoztatott relatív tüdő-tömeg valamennyi kezelt csoport esetében szignifikánsan ( $p=0,000$ ) nőtt a kezeletlen kontrollokhöz képest, mely növekedés a KpD és ND csoportok esetében szignifikánsnak ( $p=0,002$ , ill.  $p=0,004$ ) bizonyult a KD csoporthoz viszonyítva is. A csoportok agytömegekre vonatkoztatott relatív szív, lép, máj, vese, mellékvese és csecsemőmirigy tömege nem tért el jelentősen egymástól.

A szövetekben mért Ti-koncentrációk (**4. táblázat**) alapján megállapítható, hogy az intratracheálisan bejuttatott nanoanyag legnagyobb része a tüdőben rakódott le, míg a vérben és más célszervekben (agy, máj, csecsemőmirigy) a VK csoporttól szignifikánsan nem különböző fém-szinteket detektáltunk. Meglepő, hogy a szubakut kezelés végére az 1 és 3 mg/ttkg TiO<sub>2</sub> NP-kezelt csoportok tüdőszövetének Ti-koncentrációja közel azonos mértékben emelkedett, míg a 10 mg/ttkg NP-kezeltéké ennek (csak) duplájára nőtt. A kezeletlen kontroll állatok szöveteiben nem történt fém-szint meghatározás.

**4. táblázat** A csoportok perfundált célszerveiben mért Ti-koncentráció (ug/L) alakulása a kísérlet végén. Átlag±szórás, n=3. Jelmagyarázat: ###: p<0,001 vs. VK csoport; °°°: p<0,01 vs. KD csoport; +++: p<0,001 vs. KpD csoport

**Table 4** Ti concentration ((ug/L) in the perfused target organs from the groups at the end of treatment. Mean±SD, n=3. ###: p<0.001 vs. VC. °°°: p<0.001 vs. LD; +++: p<0.001 vs. MD.

Csoportok Groups	Fém-koncentráció (ug/L) az egyes szövetekben Metal concentration (ug/L) in certain tissues			
	Vér/Blood	Agy/Brain	Tüdő/Lung	Máj/Liver
K/C	-	-	-	-
VK/VC	1.543±0.941	2.846±1.619	1.494±0.925	3.953±3.306
KD/LD	3.169±1.852	2.916±2.126	43.232±6.146###	1.263±0.455
KpD/MD	3.486±2.160	6.235±3.188	42.314±6.467###°°°	2.680±2.959
ND/HD	1.000±0.000	1.241±0.418	81.488±4.261###+++	1.691±1.196

Szervezeti szintű (szisztémás) oxidatív stresszre utal a KpD és ND csoportok tüdő- és májszövetének VK csoporthoz viszonyított szignifikáns TBARS-szint emelkedése. A VK, KpD és ND csoportok agyszövetének közel azonos mértékű lipidperoxidációja alapján azonban nano-TiO<sub>2</sub> kezeléssel összefüggő KIR-szintű oxidatív stressz nem volt kimutatható (5. táblázat).

**5. táblázat** A lipidperoxidáció mértéke (TBARS-szint) a kezelés végén a csoportok egyes célszöveiben Átlag±szórás, n=3. Jelmagyarázat: #: p<0,05 vs. VK csoport

**Table 5** Lipid peroxidation (TBARS level) in certain target tissues at the end of treatment. Mean±SD, n=3. #: p<0.05 vs. VC.

Csoportok Groups	Lipidperoxidáció mértéke (nmol MDA/mg szövet) az egyes szövetekben Rate of lipid peroxidation (nmol MDA/mg tissue) in certain tissues			
	Vér/Blood	Agy/Brain	Tüdő/Lung	Máj/Liver
VK/VC	2.758±0.130	13.683±0.851	34.623±6.612	16.216±1.476
KpD/MD	2.840±0.121	14.719±1.562	46.402±7.798	24.112±1.578#
ND/HD	3.193±0.465	13.732±0.198	49.721±2.963#	25.490±5.875

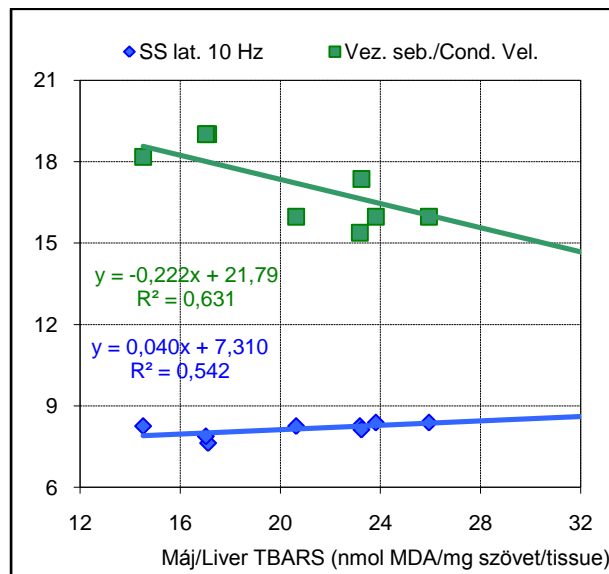
A VK, KpD és ND csoportok vér-, agy-, máj-, tüdő- és csecsemőmirigy-mintáinak GHS-szintjében és kataláz-aktivitásában nem volt lényeges eltérés a csoportok között.

## Összefoglalás, következtetések

Az ismertett munkában a patkányok légútjaiba 28 napon át intratracheálisan bejuttatott 1, 3 és 10 mg/ttkg nano-TiO<sub>2</sub> dózisok alkalmasak voltak általános és – bizonyos mértékben alátámasztott – magasabb rendű idegrendszeri toxikus hatások előidézésére. A modell adekvát voltának megállapításához ezen felül azt is meg kell vizsgálni, hogyan viszonyul a kísérletben előidézett expozíció az érintett humán populációban észlelthez illetve a határértékekhez. Kevés foglalkozási eredetű nano-TiO<sub>2</sub> expozíciós adat található a szakirodalomban. A Hext [17] által felsorolt adatok szerint az utóbbi 20 évben, Európában és Észak-Amerikában, 1 mg/m<sup>3</sup>-nél magasabb munkahelyi szint (a teljes respirábilis frakciót tekintve) nem fordult elő. A NIOSH által 2011-ben publikált határérték a TiO<sub>2</sub> lebegő porra 2,4 mg/m<sup>3</sup>, ultrafinom (azaz nano-) porra 0,3 mg/m<sup>3</sup>, heti 4x10 órás expozícióban. A patkányok napi légzési volumenét [18] alapul véve az általunk közvetlenül a légutakba applikált nano-TiO<sub>2</sub> dózis, feltételezett napi 10 órás expozíció esetén, 5, 15 és 50 mg/m<sup>3</sup> légtérbeli koncentrációnak felel meg. Ezek a fent említett határértéknél egy nagyságrenddel magasabb számok, azonban a 28 napos kezelés a patkányok várható élettartamának csak kisebb (emberi élettartamban kb. 3 évnek megfelelő) részét teszi ki.

A szubakut kísérletben az intratracheálisan instillált nanoanyag valamennyi általunk vizsgált célszövetben kimutatható volt, azaz elsősorban a tüdőbe, kis mértékben a keringésbe, más parenchimás szervbe (máj) és az agyba is bejutott. A TiO<sub>2</sub> NP-ok jelen munkában észlelt, illetőleg irodalmi adatok (ember: [11]; egér: [12; 13]) szerint fennálló idegrendszeri hatásának egy valószínű magyarázata a részecskék oxidatív stresszt generáló képessége. Az oxidatív szabad gyökök megjelenése részben a NP-oknak a környező vizes közeggel, részben a sejtfelszíni és (a részecskék internalizálódását követően) sejten belüli receptorokkal való kölcsönhatásának következménye [3]. Az is ismert, hogy sejten belül a NP-ok hajlamosak a mitokondriumokba vándorolni és az oxidatív foszforiláció megzavarásával oxidatív szabad gyökök keletkezését indukálni [19]. Az idegrendszer illetve sejtjei fokozottan érzékenyek az oxidatív terhelésre, mivel bennük a mitokondriális energiatermelő folyamatok igen intenzívek, membránjaik sok telítetlen zsírsavat tartalmaznak, antioxidáns kapacitásuk azonban alacsony [20]. A membrán-lipidek oxidatív károsodása a neuronok szintjén [21] és a magasabb funkcionális szintek mindegyikében is megmutatkozhat. Jelen kísérletben az agyba jutott Ti mennyisége és az ott kimutatott lipid-peroxidáció egyaránt csekély volt, idegrendszeri funkcionális eltérések ennek ellenére megjelentek. A májban kimutatott lipid-

peroxidáció mértéke és egyes elektrofiziológiai paraméterek közötti összefüggés (6. ábra) erre annyiban kínál értelmezési lehetőséget, hogy a májműködés károsodása – a központi idegrendszeri transzmitterek, mindenekelőtt a monoaminok, megváltozott anyagcseréjét előidézve [22] – indirekten befolyásolhatta a Ti-expozícióval összefüggő magasabb rendű idegrendszeri változásokat anélkül, hogy a fém nagyobb mennyiségben bejutott volna a központi idegrendszerbe.



**6. ábra** A 10 Hz ingerléssel kapott SS KP latenciájának (kék) és a farokideg vezetési sebességének (zöld) összefüggése a májban mért lipidperoxidáció (TBARS-szint) mértékével.

**Figure 6** Correlation of SS EP latency (blue) and tail nerve conduction velocity (green) with lipid peroxidation (TBARS level) in the liver.

Hogy a vér- és agymintákban mért belső Ti-dózis és az általános és egyes neurotoxikus hatások egy része a KpD – nem pedig a ND – csoportban volt jelentősebb mértékű, az a rendelkezésre álló adatokból nem értelmezhető maradéktalanul. Szerepet játszhatott benne, hogy a (<50 nm átmérőjű) NP-ok aggregációja a kezelő szuszpenzióban és később a patkány légútjainak közegében a szuszpenzió töménységétől (primer részecskeszámától) függően más lehetett, és ez befolyásolhatta a NP-ok felszívódását illetve más szervekbe (máj, KIR) való eljutását. Összességében a beadott NP-k Ti-tartalmának csak kis része jelent meg az agymintákban. A kérgi EP-ok latenciája és a perifériás ideg vezetési sebesség egymással összhangban levő változásai azonban arra utalnak, hogy a kérgi válasz késlekedése az afferens rostok lassabb ingerületvezetéséből is eredhetett. Ehhez járulhatott a fentebb említett máj-eredetű metabolikus hatás.

A szubakut intratracheális nano-TiO<sub>2</sub> expozíció kognitív viselkedésre gyakorolt hatását a kísérlet végén a patkányok spontán felderítő (szenzoros explorációs) aktivitásának klasszikus műszeres vizsgálatával teszteltük. A 28 napig, naponta egy alkalommal történő 1, 3 és 10 mg/ttkg dózisu TiO<sub>2</sub> NP instilláció a patkányok az OF műszer teljes (48x48 cm) alapterületén mutatott 10 perces és 1. perces spontán felfedező aktivitását és a defekáció bolus-számmal jellemezhető emocionális státuszát nem változtatta meg szignifikánsan. Azonban a csoportok 10 és 1. perces mozgásmintázatának zonális elemzésével következtetni lehetett a 3 és 10 mg/ttkg nano-TiO<sub>2</sub>-al kezelt állatok szorongás-fokozódására. A 10 mg/ttkg TiO<sub>2</sub> NP exponált állatok esetében a 10 perces felfedező aktivitás horizontális komponense csak a sarok zónában nőtt (míg centrálisan nem csökkent és a lokális aktivitás egyik zónában sem változott), illetve az 1. percben mutatott függőleges irányú viselkedéseleme nőtt a kezeletlen kontrollokhoz képest. Ezzel szemben a KpD csoport 10 perces horizontális irányú mozgásmintázatának a centrális zónában mutatott csökkenése és sarok zónában mért növekedése, továbbá a centrális/fal melletti zóna lokális aktivitás arányának csökkenése és az 1. percben mért vertikális irányú mozgásmintázatának növekedése együttesen utal a ND csoportnál erőteljesebb, TiO<sub>2</sub> NP kezeléssel összefüggő szorongás-fokozódásra. A kogníció részét képező felfedező aktivitás a mezolimbikus és mezokortikális dopaminerg neuronális transzmissziótól [25] és a motoros irányító központ (globus pallidus, substantia nigra és a cerebelláris magvak) működésétől függ. A kísérlet végén a TiO<sub>2</sub> NP exponált és kontroll patkányok egymástól jelentősen nem eltérő spontán felderítő aktivitás arra utal, hogy ezek a KIR régiók feltételezhetően kevésbé érzékeny targetjei a fenti dózisokban alkalmazott szubakut TiO<sub>2</sub> NP-knak. A szorongás-fokozódás azonban a motiváció és az emocionális állapot alakításában fontos szerepet játszó ventralis tegmentalis régió dopamin-tartalmú neuronjainak [26] érintettségére utalhat.

A 0-6. hetes kísérlet során a 7 naponkénti testtömeg gyarapodási ütem szignifikáns csökkenése TiO<sub>2</sub> NP dózis- és expozíciós idő-függést mutatott, mely azonban a KpD és ND csoportok esetében az utolsó 3 hétben nem tért el jelentősen egymástól. A kezelési periódus végén a kezelt állatok kontrollokénál szignifikánsan nagyobb abszolút tüdő tömege alátámasztja, hogy az intratracheális instillációval adagolt TiO<sub>2</sub> NP-t az alsó légutakba juttattuk. Bár a különböző dózisokkal kezelt állatok vérben csekély Ti-koncentráció eltérést sikerült mérni, a feltételezett célszervek közül a vesék dózis-függő, 1/100 testtömegre vonatkoztatott relatív tömegének növekedése utalt a Ti keringésbe és onnan egyes szövetekbe



jutására. A máj érintettségét a célszervben mért lipidperoxidáció mértékének szignifikáns emelkedése is igazolta a KpD és ND csoportokban.

A TiO<sub>2</sub> NP-ok adását követően detektálni tudtunk bizonyos általános toxikus és funkcionális elváltozásokat patkányokban, az eredmények azonban újabb kérdéseket vetnek fel és további vizsgálatokat indokolnak, elsősorban a dóziszfüggés és a neuro-funkcionális károsodások mechanizmusa terén.

A fenti kutatás a Nemzeti Tehetség Program "Egyedi fejlesztést biztosító ösztöndíjak" című, **NTP-EFÖ-P-15-0646** számú projekt keretében került megvalósításra, melyet az Emberi Erőforrások Minisztériuma képviselőjében eljáró Emberi Erőforrás Támogatáskezelő támogatott.

### **Köszönetnyilvánítás**

A szerzők hálás köszönettel tartoznak Dr. habil. Kónya Zoltán intézetvezetőnek és munkatársainak (SZTE Alkalmazott és Környezeti Kémiai Tanszék) azért, hogy biztosították a nanorészecskéket; Dr. habil. Galbács Gábor intézetvezetőnek és munkatársainak (SZTE Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék) a Ti-szintek meghatározásáért és Dr. Csontné Dr. Kiricsi Mónika adjunktusnak és munkacsoportjának (SZTE TTIK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék) a biokémiai mérések elvégzéséért.

## Irodalomjegyzék

- [1] *Buzea C., Pacheco Blandino I.I., Robbie K.:* Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases* 2007. 2. MR17-MR172.
- [2] *Keller A.A., McFerran S., Lazareva A., Suh S.:* Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *J.Nanopart. Res.* 2013. 15. 1692.
- [3] *Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J.:* Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 2005. 113. 823–839.
- [4] *European Agency for Safety and Health at Work:* Expert forecast on emerging chemical risks related to occupational safety and health. 2009. ISBN 978-92-9191-171-4.
- [5] *Kreyling W.G., Semmler-Behnke M., Moeller W.:* Health implications of nanoparticles. *J. Nanopart. Res.* 2006. 8. 543–562.
- [6] *Shi H., Magaye R., Castranova V., Zhao J.:* Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part. Fibre Toxicol.* 2013. 10. 15.
- [7] *Czajka M., Sawicki K., Sikorska K. et al.:* Toxicity of titanium dioxide nanoparticles in central nervous system. *Toxicol. in Vitro* 2015. 29. 1042–1052.
- [8] *Chen J., Poon C.:* Photocatalytic construction and building materials: From fundamentals to applications. *Building Environ.* 2009. 44. 1899–1906.
- [9] *Boffetta P., Gaborieau V., Nadon L. et al.:* Exposure to titanium dioxide and risk of lung cancer in a population-based study from Montreal. *Scand. J. Work Environ. Health* 2001. 27. 227-232.
- [10] *Lee K.P., Trochimowicz H.J., Reinhardt C.F.:* Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) by inhalation for two years. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1985. 79. 179-192.
- [11] *Oleru U.G.:* Respiratory and nonrespiratory morbidity in a titanium oxide paint factory in Nigeria. *Amer. J. Ind. Med.* 1987. 12. 173-180.
- [12] *Ze Y., Zheng L., Zhao X. et al.:* Molecular mechanism of titanium dioxide nanoparticles-induced oxidative injury in the brain of mice. *Chemosphere* 2013. 92. 1183–1189.
- [13] *Ma L., Liu J., Li N. et al.:* Oxidative stress in the brain of mice caused by translocated nanoparticulate TiO<sub>2</sub> delivered to the abdominal cavity. *Biomaterials* 2010. 31. 99–105.
- [14] *Oszlanczi G., Vezér T., Sárközi L. et al.:* Functional neurotoxicity of Mn-containing nanoparticles in rats. *Ecotox. Environ. Saf.* 2010. 73. 2004-2009.

- [15] *Papp A., Oszlnczi G., Horvth E. et al.*: Consequences of subacute intratracheal exposure of rats to cadmium oxide nanoparticles: Electrophysiological and toxicological effects. *Toxicol. Ind. Health* 2012. 28. 933-941.
- [16] *Serbinova E, Khwaja S, Reznick A Z, Packer L* :Thioctic acid protects against ischemia-reperfusion injury in the isolated perfused Langendorff heart. *Free Rad. Res. Comm.*, 1992, 17, 49-58
- [17] *Hext P.M., Tomenson J.A., Thompson P.*: Titanium dioxide: Inhalation toxicology and epidemiology. *Ann. Occup. Hyg.* 2005. 49. 461–472.
- [18] *Strohl K.P., Thomas A.J., St.Jean P. et al.*: Ventilation and metabolism among rat strains. *J. Appl. Physiol.* 1997. 82. 317-323.
- [19] *Migliore L., Uboldi C., Di Bucchianico S., Coppede F.*: Nanomaterials and neurodegeneration. *Environ. Mol. Mutagen.* 2015. 56. 149-170.
- [20] *Guerra-Araiza C., Alvarez-Mejia A.L., Sanchez-Torres S. et al.*: Effect of natural exogenous antioxidants on aging and on neurodegenerative diseases. *Free Rad. Res.* 2013. 47. 451-462.
- [21] *Coyle J.T., Puttfarcken P.*: Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* 1992. 262. 689-695.
- [22] *Yourdaydin C., Hrtnagl H., Steindl P. et al.*: Increased serotonergic and noradrenergic activity in hepatic encephalopathy in rats with thio-acetamide-induced acute liver failure. *Hepatology* 1990. 12. 695-700.
- [23] *Sheng L., Ze Y., Wang L. et al.*: Mechanisms of TiO<sub>2</sub> nanoparticle-induced neuronal apoptosis in rat primary cultured hippocampal neurons. *J. Biomed. Mater. Res.* 2015. 103A. 1141–1149.
- [24] *CDC-NIOSH*: Occupational Exposure to Titanium Dioxide. Current Intelligence Bulletin 63. Centers for Disease Control and Prevention, National Institute for Occupational Safety and Health, USA. 2011.
- [25] *Fink J.S., Smith G.P.*: Mesolimbic and neocortical dopaminergic neurons are necessary for normal exploratory behavior in rats. *Neurosci Lett.* 1980. 17. 61-65.

[26] *Gifkins A., Greba Q., Kokkinidis L.:* Ventral tegmental area DA neurons mediate the shock sensitisation of acoustic startle: A potential site of action for benzodiazepine anxiolytics. *Behav Neurosci.* 2002. 116. 785-794.