

EREDETI KÖZLEMÉNY (állatkísérletes)
ORIGINAL ARTICLE (animal experiment)Intratracheálisan adott ólomtartalmú nanorészecskék idegrendszeri hatása
patkányokon

Nervous system effects of intratracheally applied lead nanoparticles on rats

OSZLÁNCZI GÁBOR, PAPP ANDRÁS, PROF. NAGYMAJTÉNYI LÁSZLÓ

Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Népegészségtani Intézet, Szeged

Department of Public Health, Faculty of Medicine, University of Szeged

Összefoglalás: Napjainkban a legjelentősebb foglalkozási eredetű ólomexpozíciós forrás az ipar, az akkumulátor- és festékgyártás, jelentős továbbá a forrasztóanyagként történő felhasználás. Egészségügyi szempontból legnagyobb jelentősége a fém feldolgozása során a munkakörnyezetbe jutó 0,5-5 µm átmérőjű (ólompor, -gőz) aeroszol részecskék inhalációjának van. Régóta ismert a leggyakrabban a légutakon át a szervezetbe került ionos ólomvegyületek toxikokinetikája és szervspecifikus toxicitása, azonban a 10-100 nanométeres mérettartományba eső fémvegyület expozícióval összefüggő in vivo toxicitás még kevésbé ismert. Jelen kísérletünkben a tracheába instillált szervesetlen Pb-vegyület nanorészecskék expozíciójával összefüggő általános és neurotoxikológiai eltéréseket vizsgáltuk patkányokon. A kísérletben átlagosan 20 nm átmérőjű, desztillált víz vivőanyagban szuszpendált ólom-oxid nanorészecskéket (PbO NP) instilláltunk fiatal felnőtt hím Wistar patkányok (20 állat/csoport) tracheájába 2 és 4 mg/ttkg dózisban, naponta egyszer 6 hétig, heti 5 alkalommal. A vizsgálatban egy kezeletlen és egy vivőanyaggal kezelt kontroll csoportot is alkalmaztunk. Az expozíció ideje alatt naponta obszerváltuk az állatok általános állapotát és mértük azok testtömegét. A kísérlet végén egy alkalommal spontán open field aktivitást vizsgálatunk, majd elektrofiziológiai paramétereket mértünk. A kíméletes túllatást követő boncolás során meghatározásra került egyes target szervek tömege, illetve szerv-/szövetminták ólom koncentrációja. A PbO NP kezelt patkányok szignifikánsan magasabb vér, tüdő és máj ólomszintje a prolongált belső fémexpozíciót támasztja alá, míg az emelkedett agy Pb-koncentráció a fém vér-agy gáton történő átjutására és szöveti akkumulációjára utal. Megállapítható továbbá, hogy az PbO-kezelt állatok testtömege a kontroll csoportokhoz képest az expozíció harmadik hetétől szignifikáns dóziszfüggő csökkenést mutatott, míg relatív tüdőtömegük jelentősen megnőtt; illetve spontán horizontális és lokális mozgásaktivitásuk fokozódott. Az ólomexponált állatok szomatoszensoros kérgi spontán aktivitása a magasabb frekvenciák felé tolódott el, míg az ugyanitt kiváltott kérgi potenciál megnyúlt latenciát és csökkent ingerelhetőséget mutatott. Az ólom-exponált patkányok farokideg vezetési sebessége valamennyi ingerlési frekvencián csökkent a kontrollokéhoz képest. Az eredmények megerősítik az alkalmazott modellben a nano-PbO légúti expozíciójával összefüggő általános és specifikus neurotoxikus elváltozásokat, melyek hatás-biomarkerként történő alkalmazása a neurotoxikus hatások korai detektálását és hatékonyabb prevencióját eredményezheti a mindennapi foglalkozás-egészségügyi gyakorlatban.

Kulcsszavak: nanorészecske, ólom, neurotoxicitás, motilitás, elektrofiziológia, patkány

Abstract: The most important sources of occupational lead (Pb) exposure are today battery and pigment manufacturing, but this heavy metal is present also in solders. The highest health relevance belongs to inhalation of aerosol (Pb dust and fume) particles of 0.5-5 µm diameter, emitted into the workplace environment during Pb processing. Toxicokinetics and organ specific toxicity of inhaled Pb compounds is well known but the data on in vivo toxicity from exposure to metal-containing particles of 10-100 nm are far from complete. In the present study, nanoparticles of an inorganic Pb compound were instilled into rats' trachea, and general and

EGÉSZSÉGTUDOMÁNY
HEALTH SCIENCE

Közlésre érkezett:

Submitted:

Elfogadva:

Accepted:

57/1 75-91(2013)

57/1 75-91(2013)

2011. november 23

November 23 2011

2012 február 15

February 15 2012

PAPP ANDRÁS

6720 SZEGED, DÓM TÉR 10.

tel: +(36-62)-545-119

fax: +(36-62)-545-120

e-mail: papp.andras@med.u-szeged.hu

neurotoxicological alterations were investigated. Lead oxide nanoparticles (PbO NPs) of 20 nm mean diameter were instilled in the trachea of adult male Wistar rats in 2 and 4 mg/kg b.w. dose, suspended in distilled water as vehicle, one daily, 5 days per week, for 6 weeks. An untreated and a vehicle treated group was also included. The animals' body weight and general state was daily noted during exposure.

At the end of the experiment, spontaneous open field activity was tested once, and electrophysiological parameters (spontaneous and evoked cortical activity, tail nerve conduction velocity) were recorded. Following gentle sacrifice, the rats were dissected, the target organs were weighed, and Pb level in tissue samples was determined.

Significantly elevated Pb concentration in the PbO NP treated rats' blood, lung and liver indicated prolonged inner metal exposure, while elevated brain Pb showed passage of the metal through the blood-brain barrier and its deposition. Body weight of the Pb treated rats was significantly and dose-dependently lower than in the controls from the 3rd week of exposure, their relative lung weight increased substantially, and their horizontal and local motility increased. Spontaneous activity in the treated rats' somatosensory cortex was shifted to higher frequencies, and the evoked response in the same area had longer latency reduced excitability. Tail nerve conduction velocity in the treated rats was reduced, compared to controls, at all stimulation frequencies.

The results emphasize the general and nervous system toxic alterations due to exposure by PbO NPs in the model used. Utilizing these as effect biomarkers may enable early detection and better prevention of neurotoxic effects in the daily practice of occupational hygiene.

Key words: nanoparticle, lead, neurotoxicity, motility, electrophysiology, rat

Bevezetés

Az ólommérgezés megjelenése a korai emberi társadalmak kialakulásával egyidős; amióta csak ólomot használnak, a mérgezés lehetősége adott. Az ókori görögök bányászat során, a rómaiak főként a boriváson keresztül exponálódtak. Az első írásos emlék a foglalkozási eredetű ólommérgezésről a második századból származik és az ókori rómaiak nevéhez fűződik (1). Magyarországon az ólmozott benzin forgalmazásának 1999-es tiltását követően az ólommérgezés elsősorban foglalkozási megbetegedésként fordul elő, melyekben ólom expozíciós forrás a kohászat és fémhulladék-feldolgozás, az akkumulátorgyártás, ahol az ólom főként aerosol (por, füst) inhaláció útján juthat be az emberi szervezetbe. A belélegzett ólomrészecskék mérete rendkívül fontos a légúti expozíció szempontjából. Az ólomfüstben, ultrafinom porban jelen lévő PM₅, valamint a nanorészecskék a tüdőalveolusokig juthatnak, ahonnan specifikus mechanizmusokkal (transcitosis caveola-képződéssel, (2) átjutva a kapilláris endothelen direkt tüdőkárosító hatást fejtenek ki, illetve a centrális kompartmentbe jutva, további barrier rendszerek szerkezetét megbontva más target szervek/szövetek specifikus működését is befolyásolhatják.

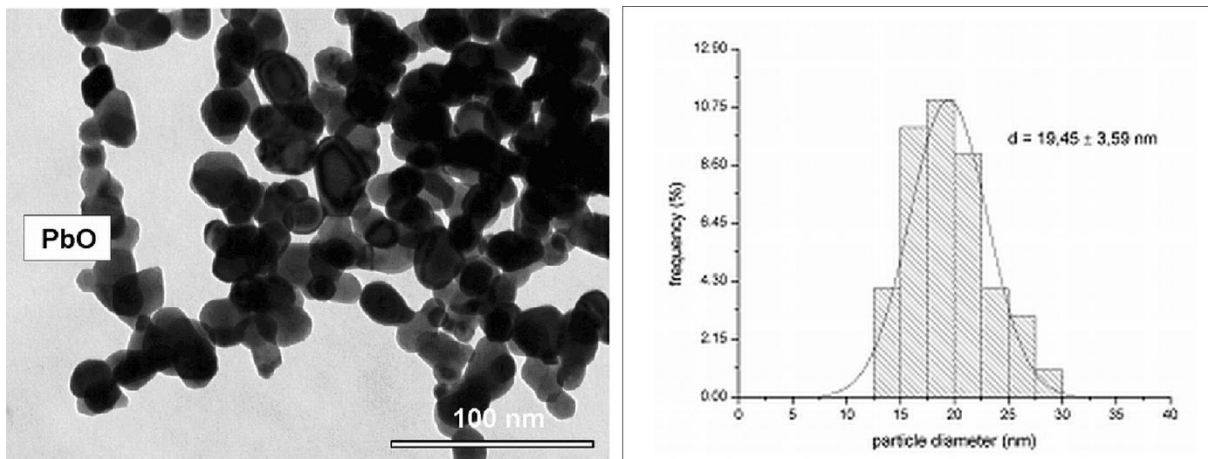
Ismeretes, hogy az ólom ionos formái az egészséges felnőtt szervezet vér-agy gátján – vérólm koncentráció függvényében – csekély mértékben jutnak át (3), azonban a nanorészecskék (nanopartikulumok, NP-k) számára a vér-agy gát barrier szerepe már nem ennyire egyértelmű (4).

Jelen vizsgálatban ólom-oxid (PbO) NP-k intratracheális instillációját végeztük patkányokban 6 héten át, majd a kezelés végén az állatok ólom NP expozíciójával összefüggő központi és perifériás idegrendszeri funkcionális elváltozásait, továbbá a NP-k okozta általános toxikus hatásokat vizsgáltuk. A vizsgálat MÁB engedélyszáma XXI./02039/001/2006.

Anyagok és módszerek

Tesztanyag

Az PbO nanorészecskéket a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Karának Alkalmazott Kémia Tanszékén szintetizálták. Az átlagos részecskeméret $19,5 \pm 3,6$ nm volt, röntgen-diffrakcióval és transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) megállapítva (1. ábra).



1. ábra: Az intratracheális instillációhoz használt PbO nanorészecskék.

Balra: TEM (transzmissziós elektron mikroszkopia) kép. Jobbra: méreteloszlás.

Fig. 1: The PbO nanoparticles used for intratracheal instillation to the rats.

Left, TEM. (Transmission electron microscopy) Right, size histogram.

Laboratóriumi állatok, kezelési mód

Felnőtt, hím Wistar patkányokat (280 ± 20 g induló testtömeg) kezeltünk intratracheális instillációval. Az állatok a beszállítást követően egy hétig akklimatizálódtak (0. hét). Tartásuk konvencionális állatházi körülmények – 12-12 óra világos-sötét megvilágítási periódus, $22 \pm$ °C hőmérséklet, $60 \pm 10\%$ relatív páratartalom – között történt. Az ivóvíz és a normál rágcsálótáp (CRLT/N, Szindbád Ltd, Hungary) korlátlanul állt az állatok rendelkezésére. A patkányokat (összesen 40) az akklimatizáció végén mért testtömegük alapján randomizálva négy (kezelési) csoportra osztottuk ($n=10$) – kezeletlen kontroll (K), vivőanyaggal kezelt (VK), tesztanyag kis dózis (KD) és tesztanyag nagy dózis (ND). A kezeléseket 6 hétig (5 nap/hét), napi egyszeri alkalommal végeztük.

Az alkalmazott dózisokat (I. táblázat) – direkt összehasonlításra alkalmas irodalmi adatok hiányában – indirekt módon, az alábbiak szerint határoztuk meg. A Strohl és mtsai (5) által publikált fiziológiás eredmények alapján a különböző patkánytörzsek légzési térfogata 24-32 ml/100 g bruttó testtömeg között változik. Átlag 30 ml-t véve alapul, a 24 órára becsült teljes belégzési térfogat közel $0,5$ m³. Coffigny és mtsai (6) valamint Pinon-Llatailade és mtsai (7) jelentős ólom koncentrációkat (500-700 ppb a vérben) értek el olyan

levegő inhaláltatásával, amelynek ólomtartalma 5 mg/m³ volt. Ezen adatok kombinálásával körülbelül 2,5 mg/ttkg expozíciós értéket kapunk; de (figyelembe véve az elkerülhetetlen pontatlanságokat) végül az alacsonyabb inhaláltatott PbO NP dózist ez alatt, a magasabbat pedig e felett választottuk.

I. TÁBLÁZAT: **Intratracheális PbO NP kezelési csoportok és dózisok.**

Csoport	Kód	Állatszám	Anyag	Dózis (mg fém/ttkg)
Kezeletlen kontroll	K	10	---	---
Vivőanyagos kontroll	VK	10	aqua destillata	---
PbO NP, kis dózis	KD	10	PbO nanorészecske-szuszpenzió	2
PbO NP, nagy dózis	ND	10		4

TABLE I: **Intratracheal PbO NP treatment: groups and doses.**

Group	Code	Number of animals	Substance	Dose (mg metal/kg b.w.)
Untreated control	K	10	---	---
Vehicle control	VK	10	aqua destillata	---
Lead, low dose	KD	10	PbO nanoparticle suspension	2
Lead, high dose	ND	10		4

A kezelés során a desztillált vízben szuszpendált nanorészecskéket (KD, ND csoport), illetve a vivőanyagot (VK csoport) a patkányok tracheájába instilláltuk. Az instillált térfogat 1 ml/ttkg volt. Az esetleges mikroprecipitáció, aggregáció elkerülése végett az instilláció előtt a szuszpenziót ultrahanggal kezeltük. Az expozícióhoz az állatokat rövid éteres narkózist követően egy erre a célra készített, 60 fokban megdöntött keretre rögzítettük. A tracheát erős, fókuszált fénnel transzdermálisan megvilágítottuk, majd egy „házilagosan” készített patkány laringoszkóp segítségével láthatóvá tettük a glottist. A hangrések között bevezettünk a légcsőbe egy körülbelül 1mm átmérőjű katétert, mely a kimért nanoszuszpenziót tartalmazó 1 ml-es fecskendőhöz csatlakozott.

Általános toxikus hatások

Az állatok testtömegét minden kezelés előtt lemértük, melyből a testtömeg változás ütemét és a beadandó napi dózist számoltuk. Az észlelt klinikai tüneteket (megváltozott viselkedés, borzolt szőrzet stb.) szintén naponta dokumentáltuk.

Neurotoxikus hatások

Spontán motoros aktivitás

A hathetes kezelést követően (utolsó kezelés másnapján) a patkányok spontán motoros aktivitását open field (OF) készülékben (Conducta 1.0 System, Experimetria Ltd, Hungary) vizsgáltuk. A készülék infravörös fénykapuk segítségével detektálta az egyes állatok kitüntetett (horizontális, lokális, vertikális) mozgásirányának paramétereit (időtartam, alkalomszám). A fénykapu megszakításokból számította ki az állatonként 10 perc időintervallum alatt helyváltoztatással, helyzetváltoztatással, ágaskodással, ill. mozdulatlansággal töltött időt.

Elektrofiziológiai paraméterek

Az OF tesztekét követő napon – a központi és perifériás idegrendszer működését jelző paraméterek regisztrálás céljából – az állatokat intraperitoneálisan adott uretánnal (1000 mg/ttkg) altattuk el. Az állatok fejének rögzítése után feltártuk a bal agyféltekét. A szabaddá tett durát vékony réteg vazelinnel védtük a kiszáradás ellen. Fél óra múlva ezüst elvezető elektródát helyeztünk a bajuszszálak primer szomatoszenzoros (SS) kérgi vetülési mezőjére. Először 6 percnyi spontán elektrokortikogramot (ECoG) rögzítettünk, ezt követően szomatoszenzoros kiváltott potenciálokat (SS EP) regisztráltunk. Szomatoszenzoros ingerként a patkány kontralaterális bajuszmezőjébe szúrt tűpáron keresztül gyenge elektromos ütések (3-4 V; 0,05 msec; 1; 2 és 10 Hz) alkalmaztunk. (EP: evoked /kiváltott/ potencial)

A perifériás idegrendszer állapotát a farokideg összetett idegi akciós potenciáljának mérésével vizsgáltuk. Az akciós potenciált a faroktónél beszúrt tűpáron adott elektromos ingerrel (4V; 0,05 msec; 1; 20 és 50Hz) váltottuk ki, és attól 50 mm-re disztálisan beszúrt másik tűpár segítségével vezettük el.

Az ECoG felvételtől meghatároztuk a különböző hullámsávokra (delta, théta, alfa, béta-1 és béta-2) eső relatív teljesítményt. A kérgi kiváltott válaszból egy 50-es sorozatot vettünk fel, melyeket átlagoltunk, 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.

Szerv- ill. szövet-specifikus toxikus hatások, szöveti fémszintek

Az elektrofiziológiai vizsgálatokat követően az állatokat kíméletesen túaltattuk. A boncolás során dokumentálásra kerültek az észlelt makroszkópos pathológiás eltérések, majd a feltételezett target szervek (agy, thymus, tüdő, máj, szív, vese, mellékvese) tömegét lemértük, mely alapján az agy tömegére vonatkoztatott relatív szervtömeg értékeket származtattuk. Az abdominális aortából vett vérmintából, illetve az egyik oldali agyfélteke szövetéből –

salétromsavas emésztést követően, ICP-MS (induktív csatlakozású plazma-tömegspektrométer) készüléssel – ólom koncentráció meghatározás történt.

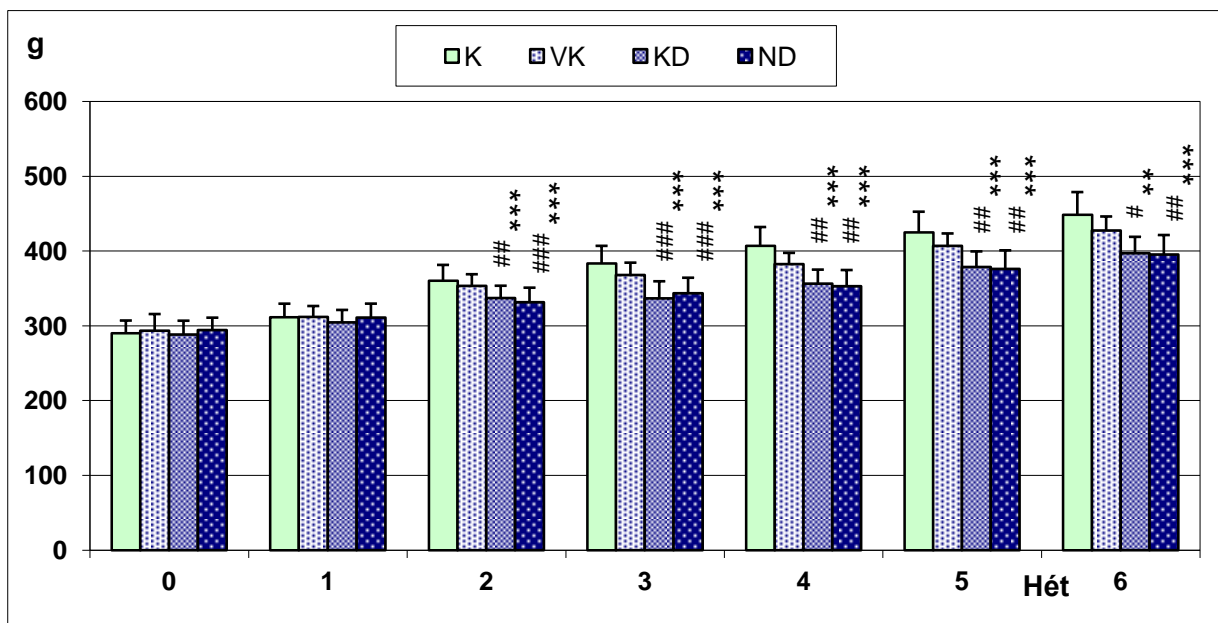
Statisztika

A vizsgálatokban nyert adatok eloszlását *Kolmogorov-Smirnov* teszttel vizsgálatuk, melyek normál eloszlása esetén a további statisztikai analízist egyutas ANOVÁ-val és post hoc *Scheffe* teszttel végeztük. Az eredményeket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak. A vér- és agyszövet Pb szintje, illetve az általános és neuro-funkcionális paraméterek közötti lineáris korrelációt a MS Excel saját „lineáris illesztés” függvényével vizsgáltuk, mely az R^2 értékén felül az illeszkedés szignifikanciáját is kimutatja F-próba segítségével (itt is $p < 0,05$ határt alkalmaztunk).

Eredmények

Általános toxikus hatások

A prolongált PbO NP expozíció második hetétől a KD és ND csoportok testtömeg-növekedés ütemének a K és VK csoportokhoz viszonyított dóziszfüggő, szignifikáns csökkenése volt tapasztalható a 6 hetes kezelés végéig. A K és VK csoport közötti minimális eltérés arra utalt, hogy az éteres altatás és az instilláció okozta stressz a testtömeg alakulásra önmagában nem gyakorolt számottevő hatást (2. ábra).



2. ábra: Az PbO NP-vel kezelt és kontroll patkányok testtömeg-változása a vizsgálat folyamán.

Átlag+SD, n=10. Inzert: csoportkódok. *, ***, $p < 0,01$; 0,001 vs. K; #, ###: $p < 0,01$; 0,001 vs. VK.

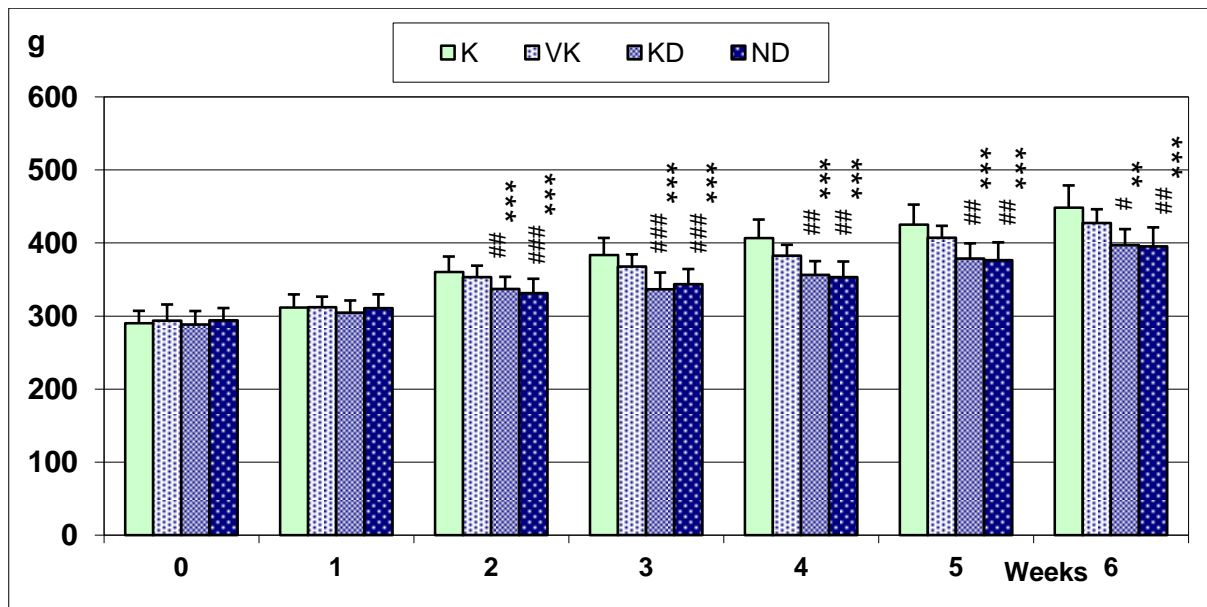


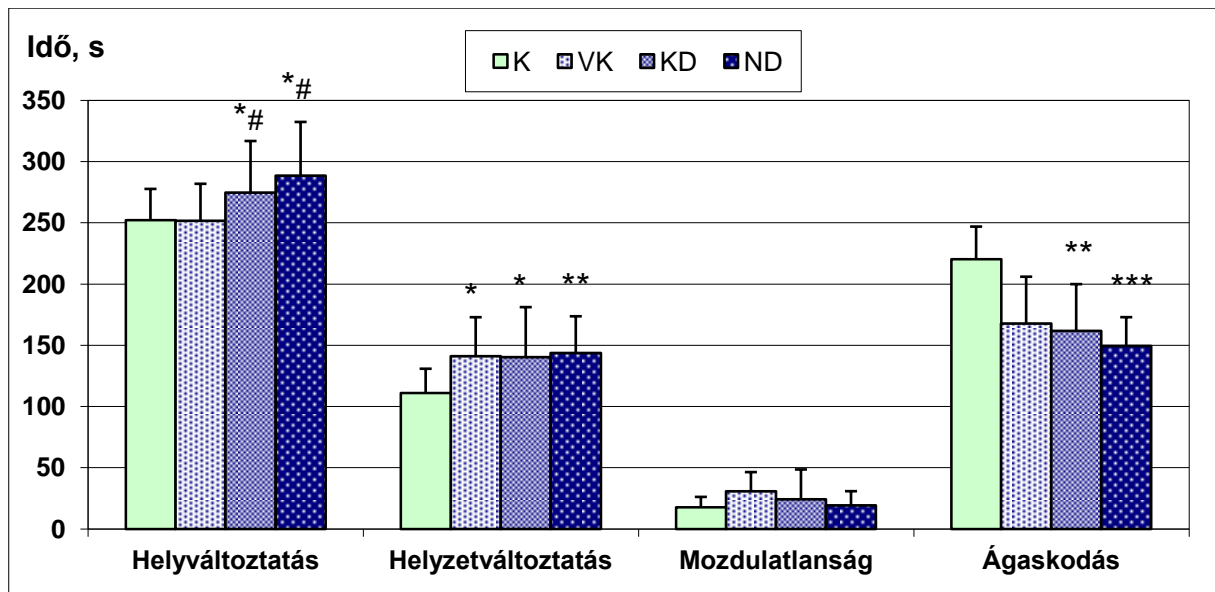
Fig. 2: Body weight gain of the Pb NPs treated and control rats following experiment.

Mean±SD, n=10. Insert: group codes. *, ***, p<0.01, 0.001 vs. K; #, ##, ###: p<0.01, 0.001 vs. VK.

Neurotoxikus hatások

Spontán motoros aktivitás

Az utolsó kezelés másnapján egy alkalommal – állatonként 10 percig OF készülékben – tesztelt spontán késztetés aktivitás eredmény azt mutatta, hogy a kis és nagy PbO NP dózissal kezelt patkányok helyváltoztató mozgással (horizontális irányú mozgáskomponens) töltött ideje – a K és a VK csoportokhoz képest is – dózisfüggően, szignifikánsan növekedett. Az PbO NP exponált csoportok ágaskodás (vertikális irányú) aktivitása dózisfüggő szignifikáns csökkenést, míg a helyzetváltoztató (lokális, elsősorban mosakodás, vakarózás) mozgás aktivitása szignifikáns növekedést mutatott a kezetlen kontrollokhoz képest. Az OF teszt során mért mozdulatlansággal töltött idő nem mutatott jelentős különbséget a négy csoport állatainál (3. ábra).



3. ábra: A patkányok „open field” készülékben mért spontán lokomotoros aktivitása 6 hetes Pb NP expozíciót követően.

Átlag+SD, n=10. *, **, ***: p<0,05; 0,01; 0,005 vs. K. #: p<0,05 vs. VK.

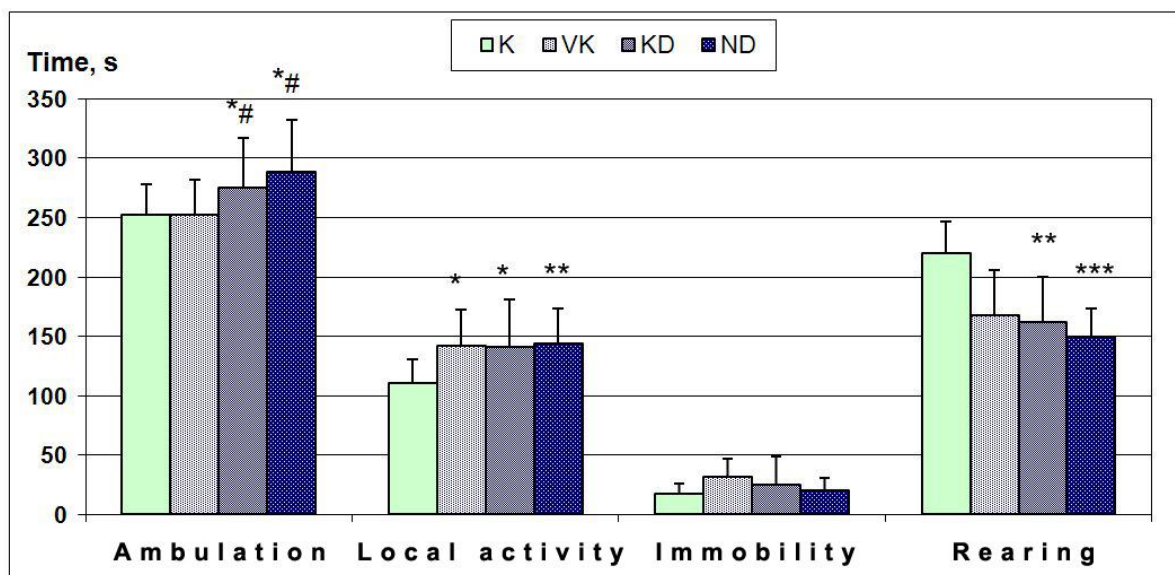
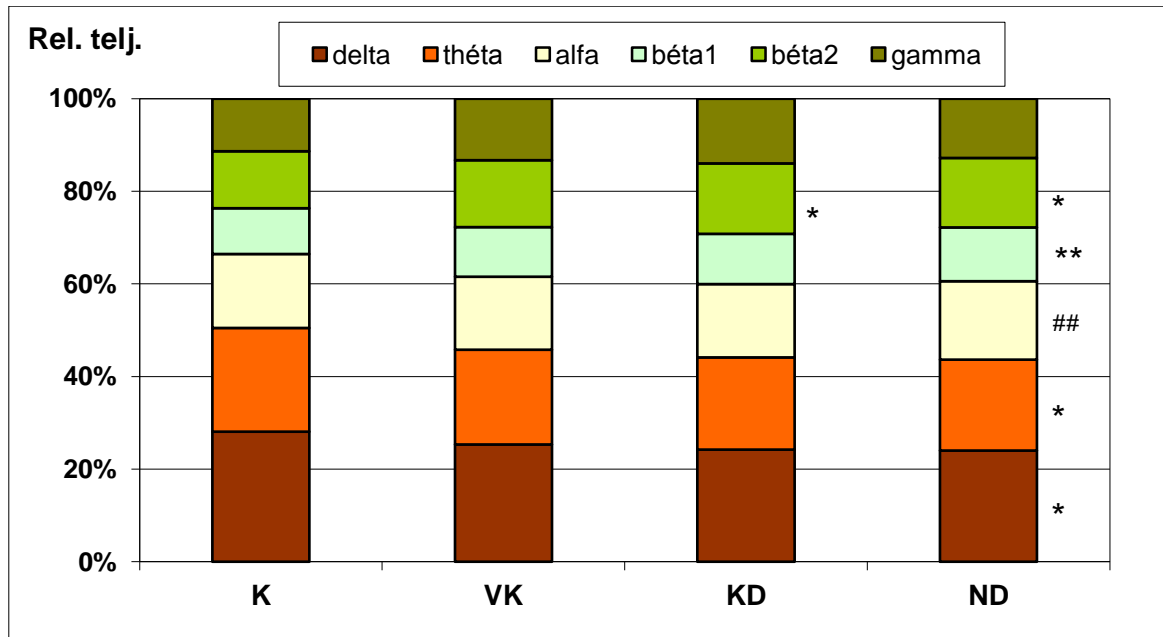


Figure 3: Open field activity of the rats treated with Pb NPs and of the corresponding controls after 6 weeks exposure.

The data (Mean+SD, n=10) represent the time spent in the given form of activity. Insert: group codes. *, **, ***: p<0.05, 0.01, 0.001 vs. K; #: p<0.05 vs. VK.

Elektrofiziológiai paraméterek

A szomatoszenzoros ECoG-on az alacsony frekvenciasávok aktivitásának csökkenése és a magasabb frekvenciák aktivitásának növekedése volt megfigyelhető. A változás a béta-2 sáv kivételével csak a ND-nál volt szignifikáns (4. ábra).



4. ábra: Az Pb NP-k hatása a szomatoszenzoros kérgi spontán aktivitás teljesítmény-spektrum alakulására.

Az oszlopok az egyes ECoG sávokra (ld. inzert) eső relatív teljesítményt mutatják. Átlag, n=10. *, **: p<0,05; 0,01 vs. K. ##: p<0,01 vs. VK.

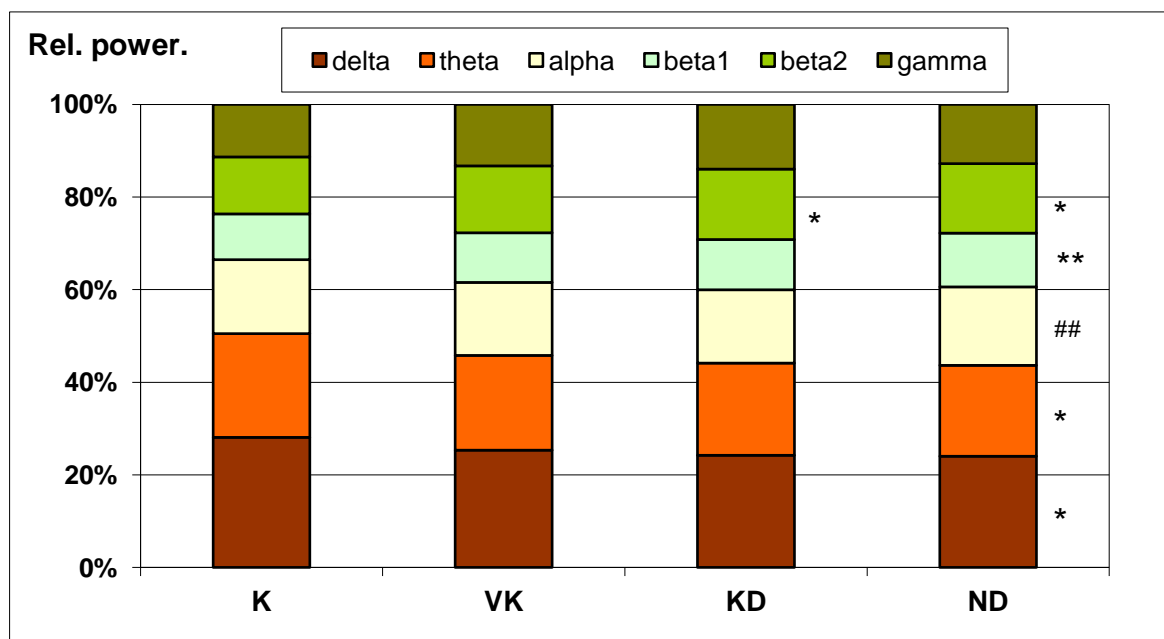
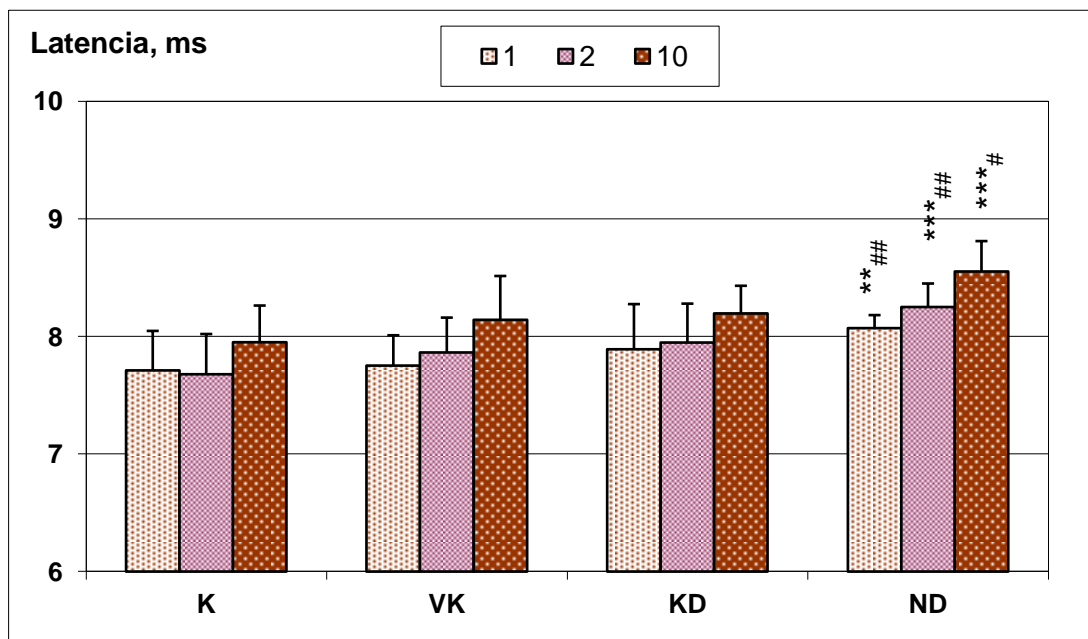


Fig. 4: The effect of Pb NPs on the power spectrum of the electrocorticogram recorded from the rats' somatosensory cortex.

Ordinate: relative power of the ECoG bands (see insert). *, **: p<0.05, 0.01 vs. K; ##: p<0.01 vs. VK, always between identical bands.

A K és a VK csoportokban a szomatoszenzoros kiváltott potenciál (SS EP) latenciája nem tért el jelentősen egymástól. Tényleges frekvenciafüggő növekedés csak a 10Hz-es stimulációnál volt megfigyelhető. A KD-al kezelt csoportnál a latencia csak minimálisan növekedett, de a

frekvenciafüggő növekedés (10Hz az 1Hz-el szemben) szignifikánssá vált. Az ND csoportban; a latencia szignifikánsan megnyúlt, és a frekvenciafüggő növekedés is kifejezettebbé vált (5. ábra).



5. ábra: Az Pb NP-k hatása a SS EP latenciájára; 1, 2, és 10 Hz ingerlési frekvencia mellett (ld. inzert).

Átlag+SD, n=10. **, ***: $p < 0,01$; $0,001$ vs. K; #, ##: $p < 0,05$; $0,01$ vs. VK (azonos frekvencián, különböző csoportok között); °, °°: $p < 0,05$; $0,001$ (vs. 1 Hz-es stimuláció ugyanazon a csoporton belül).

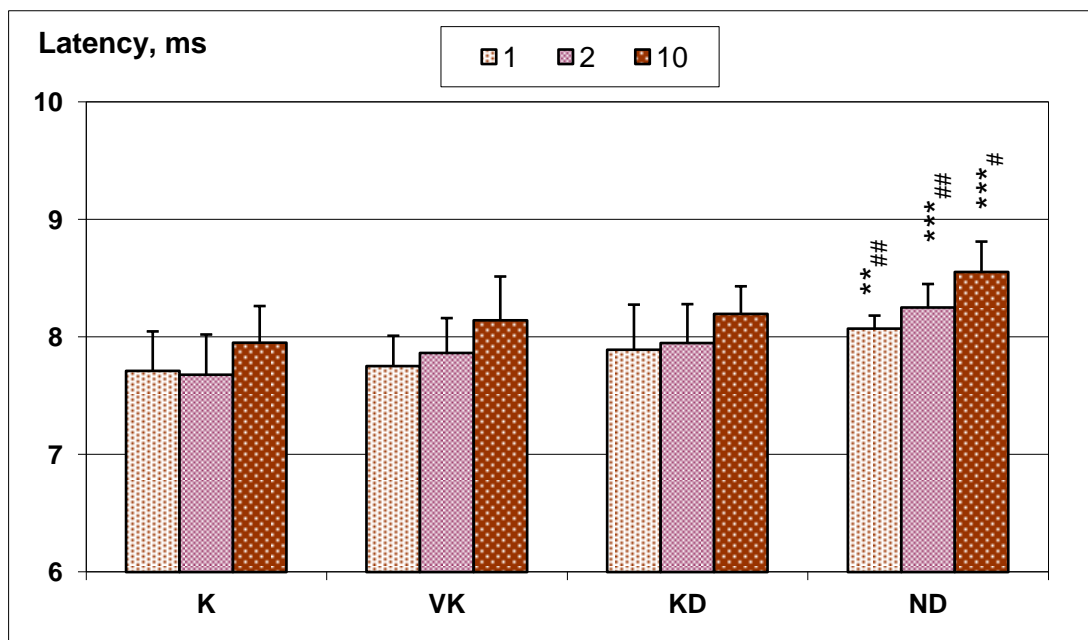
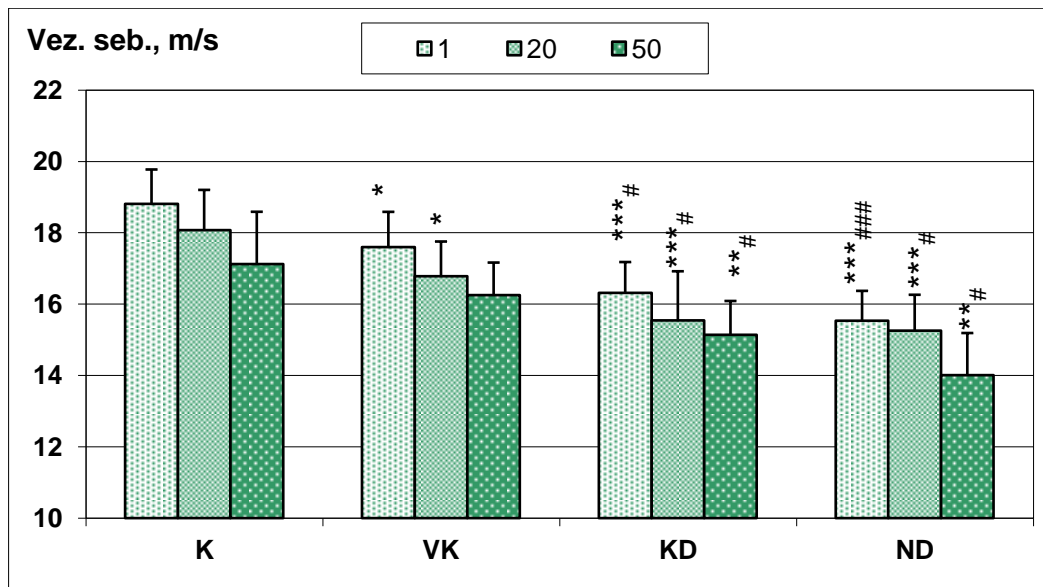


Fig. 5: Onset latency of the somatosensory evoked potential at various stimulation frequencies (see insert for frequency in Hz) after 6 weeks Pb NP exposure.

Mean+SD, n=10. **, ***: $p < 0,01$, $0,001$ vs. K; #, ##: $p < 0,05$, $0,01$ vs. VK (between identical frequencies among groups at the SS EP); °, °°: $p < 0,05$, $0,001$ (vs. 1 Hz stimulation within a group at the SS EP).

A farokideg vezetési sebessége csökkent a PbO NP kezelt csoportokban. A KD és az ND csoportok esetében dózisfüggő szignifikáns eltérést tapasztaltunk a K és a VK csoportok eredményével szemben. A farokideget nagyobb frekvenciával is ingereltük (20 és 50 Hz az 1 Hz helyett). Az idegi akciós potenciál latenciájának (és az amplitúdójának) változásai mutatták az ideg csökkent frekvencia-követő képességét a kezelt állatokban (6. ábra).



6. ábra: Az Pb NP-k hatása a farokideg vezetési sebességére 6 heti kezelést követően, különböző ingerlési frekvenciákon (ld. inzert).

Átlag+SD, n=10. *, **, ***: p<0,05; 0,01; 0,001 vs. K; #, ##, ###: p<0,05; 0,01; 0,001 vs. VK (azonos frekvenciákon, különböző csoportokra); °, °°: p<0,05; 0,01 (vs. 1 Hz-es ingerlés ugyanazon csoportban).

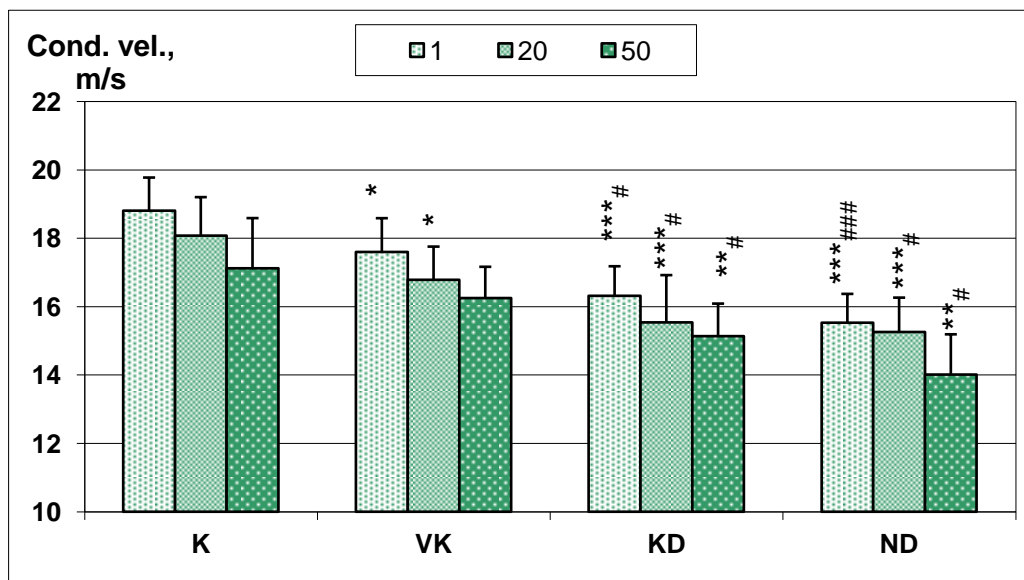


Fig. 6: Conduction velocity of the tail nerve after 6 weeks treatment by Pb NPs, at various stimulation frequencies (see insert).

Mean+SD, n=10. *, **, ***: p<0.05, 0.01, 0.001 vs. K; #, ##, ###: p<0.05, 0.01, 0.001 vs. VK (between identical frequencies among groups); °, °°: p<0.05, 0.01 (vs. 1 Hz stimulation within the same group).

Szerv- és szövet-specifikus toxikus hatások

A boncolás során makroszkóposan vizsgált és lemért szervek közül csak a tüdőnek nőtt meg szignifikánsan az agyra vonatkoztatott relatív tömege (II. táblázat); a nagy dózissal kezelt állatok tüdeje ezen felül láthatóan emphysemás volt. Az abszolút agytömeg, amit vonatkoztatási alapul használtunk, nem volt teljesen stabil (K: $2,164 \pm 0,088$ g; VK: $2,086 \pm 0,068$ g; KD: $2,092 \pm 0,159$ g; ND: $2,058 \pm 0,062$ g, $p < 0,05$ vs. K) de sokkal kevésbé volt érintve, mint a testtömeg.

II TÁBLÁZAT: **Relatív szervtömegek (agytömegekre vonatkoztatva) 6 hét kezelés után.**

Szervek	Agytömegekre vonatkoztatott relatív szervtömegek (átlag \pm SD, n=10)			
	K	VK	KD	ND
Tüdő	0,707 \pm 0,080	0,714 \pm 0,061	0,976 \pm 0,113***###	1,128 \pm 0,125***###
Máj	6,599 \pm 0,740	6,680 \pm 0,798	6,353 \pm 0,719	6,446 \pm 0,667
Vesék	1,281 \pm 0,112	1,288 \pm 0,081	1,366 \pm 0,118	1,328 \pm 0,120
Szív	0,541 \pm 0,054	0,551 \pm 0,043	0,536 \pm 0,055	0,517 \pm 0,049
Lép	0,396 \pm 0,059	0,367 \pm 0,062	0,379 \pm 0,085	0,361 \pm 0,041
Thymus	0,191 \pm 0,023	0,199 \pm 0,054	0,196 \pm 0,043	0,199 \pm 0,040
Mellékvesék	0,020 \pm 0,006	0,026 \pm 0,008	0,025 \pm 0,008	0,024 \pm 0,007

***: $p < 0,001$ vs. K; ###: $p < 0,001$ vs. VK.TABLE II: **Relative organ weights (calculated to brain weight) after 6 weeks intratracheal exposure by PbO NPs.**

Organs	Relative organ weights (calculated to brain weight, Mean \pm SD, n=10)			
	K	VK	KD	ND
Lungs	0,707 \pm 0,080	0,714 \pm 0,061	0,976 \pm 0,113***###	1,128 \pm 0,125***###
Liver	6,599 \pm 0,740	6,680 \pm 0,798	6,353 \pm 0,719	6,446 \pm 0,667
Kidneys	1,281 \pm 0,112	1,288 \pm 0,081	1,366 \pm 0,118	1,328 \pm 0,120
Heart	0,541 \pm 0,054	0,551 \pm 0,043	0,536 \pm 0,055	0,517 \pm 0,049
Lien	0,396 \pm 0,059	0,367 \pm 0,062	0,379 \pm 0,085	0,361 \pm 0,041
Thymus	0,191 \pm 0,023	0,199 \pm 0,054	0,196 \pm 0,043	0,199 \pm 0,040
Adrenals	0,020 \pm 0,006	0,026 \pm 0,008	0,025 \pm 0,008	0,024 \pm 0,007

***: $p < 0,001$ vs. K; ###: $p < 0,001$ vs. VK.

Szöveti fémkoncentráció

Hat heti kezelés után magas szöveti ólomszintet mértünk a Pb NP kezelt állatok vér-, agy-, máj- és tüdő mintáiban (III. táblázat).

III. TÁBLÁZAT: Pb szintek a kezelt állatok egyes szöveteiben.

Szöveti ólomkoncentrációk (ppb, átlag ± SD)			
Szövetek	Kezelt csoportok (n=6 állat)		
	VK	KD	ND
Vér	226±125	1694±290***	4012±1031***##
Agy	175±49	1056±209***	1870±443***##
Máj	80±12	2166±696***	4690±695***##
Tüdő	5418±4482	2778249±1232587**	4369691±2060069**

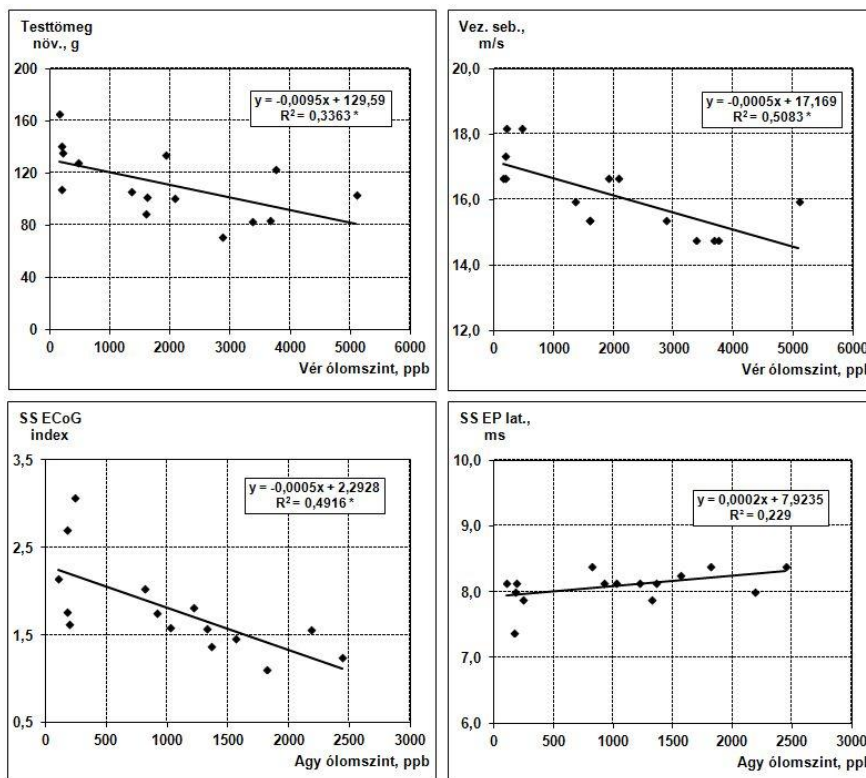
** ,***: p<0,01; 0,001 vs. VK; ##, ###: p<0,01; 0,001 vs. KD.

TABLE III: Pb levels in the different tissues of treated rats

Pb levels in tissues (ppb, Mean± SD)			
Tissues	Treated groups (n=6 animals)		
	VK	KD	ND
Blood	226±125	1694±290***	4012±1031***##
Brain	175±49	1056±209***	1870±443***##
Liver	80±12	2166±696***	4690±695***##
Lung	5418±4482	2778249±1232587**	4369691±2060069**

** ,***: p<0,01; 0,001 vs. VK; ##, ###: p<0,01; 0,001 vs. KD.

Az egyes szövetek fémkoncentrációja a növekvő Pb expozícióval párhuzamos emelkedést mutatott. A PbO NP kezelt csoportok heti átlag testtömeg változása, továbbá a perifériás ideg vezetési sebessége korrelációt mutatott ($R^2 > 0,34$; $p < 0,05$) a vérólm koncentrációval. A KD és ND csoportok szomatoszenzoros ECoG indexe az agyszövet ólomszintjével korrelált ($R^2 > 0,51$; $p < 0,05$), míg a szomatoszenzoros kiváltott potenciál latencia idő és az agyszövet ólomszint értékekhez illesztett lineáris $p < 0,05$ értékűnek bizonyult (7. ábra).



7. ábra: A vérben ill. agyban mért Pb-szintek korrelációja különböző neuro-funkcionális és toxikológiai paraméterekkel.

*: $p < 0,05$ a lineáris illeszkedésre.

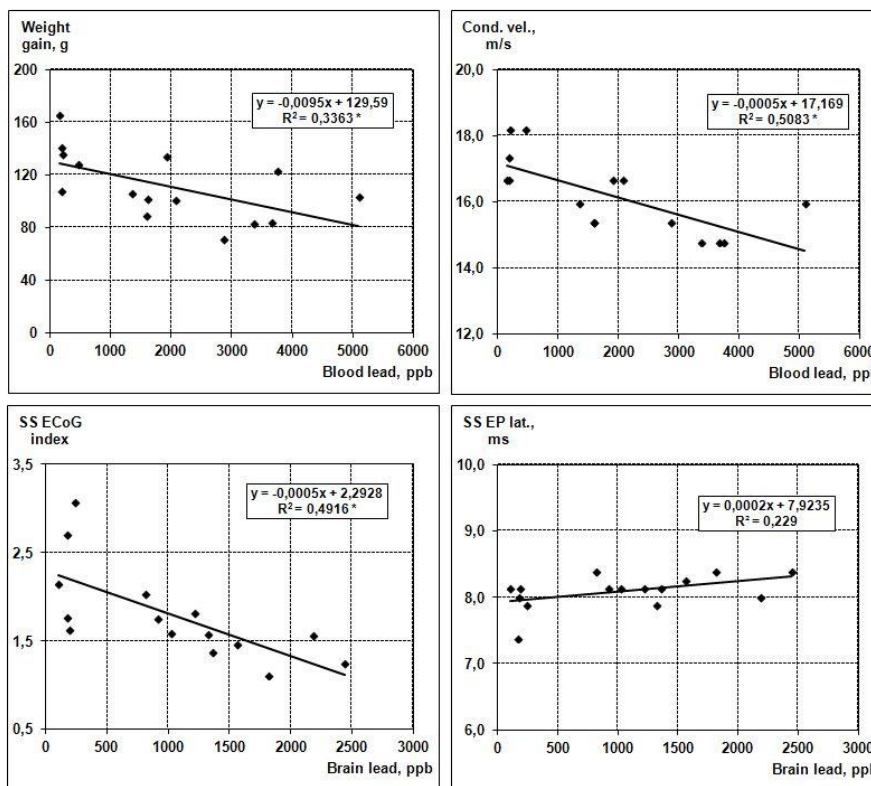


Fig. 7: Correlation of the brain or blood Pb level to certain measured neuro-functional and toxicological parameters.

*: $p < 0,05$ for the linear fit.

Megbeszélés

Jelen kísérletben hasonló elektrofiziológiai változásokat tapasztaltunk, mint korábbi munkáinkban, amikor az állatok per os kapták az ólom-acetát oldatot (8). Ez, valamint az emelkedett ólomszint a kezelt patkányok agyában (mely hasonló volt a korábbi ólom-acetátos kezelés következtében kialakuló szintekhez) azt jelzi, hogy a nanorészecskék nem csupán felszívódtak a légutakból, de fémtartalmuk az agyba is eljutott. A nanorészecskék maguk is képesek átlépni a vér-agy gáton (9); de éppígy lehetséges, hogy fagocitózis után, a fagoszómák belsejében uralkodó savas közegben felületükről fém ionok oldódnak le (10). Az Pb ionok károsítják a vér-agy gátat (11) tovább növelve annak valószínűségét, hogy mind ionos, mind nanorészecske formában átjusson rajta az ólom.

A jelenlegi munka eredményeit összehasonlítva a korábbiakkal elmondhatjuk, hogy a nanorészecskék instillációjával sokkal hatásosabban juttatható el az Pb az agyba, mint oldatban, per os adagolva. (Az PbO nanorészecskéket, 4,0 mg/kg koncentrációban a tracheába adagolva 6 héten keresztül, átlag 1870 ppb Pb szintet hoztak létre az agyban, míg 500 mg/kg Pb acetát per os adagolva 10 héten keresztül kb. 2500 ppb-t). A nem kezelt állatok vér-ólom szintje (VK csoport, *III. táblázat*) hasonló volt a más kísérleteinkben, azonos módon kezelt állatokéhoz, továbbá megfelelt az Pb-nak nem kitett emberek esetében tapasztalt vérszintnek, ami a modell adekvát voltát mutatja.

A külső/belső expozíció tekintetében a modell jósága nehezebben eldönthető. A *Coffigny és mtsai.* (6), valamint *Pinon-Lataillade és mtsai.* (7) által alkalmazott, 5 mg/m³ töménységű PbO sokkal több, mint ami foglalkozási expozícióra az irodalomban található. Egy akkumulátorgyár légtérében 1,06 mg/m³ ólmot mértek, az exponált dolgozók vérében pedig 635 ppb-t. (kontrollok: 87 ppb) (12). Másik, hasonló üzem levegőjében 0,6 mg/m³, míg a munkások vérében 500 ppb volt az ólomszint (13). Ezen adatok a fentebb leírt kalkulációval 0,5 és 0,3 mg/ttkg napi dózisnak felelnek meg. *Coffigny és Pinon-Lataillade* munkacsoportja ráadásul kétszer olyan hosszú inhalációs kezelést alkalmazott, mint a mi kísérletünkben, és 3-8-szor alacsonyabb vér-ólomszinteket kaptak. Az intratracheális instilláció (mely könnyebben és pontosabban hajtható végre) tehát sokkal hatékonyabbnak tűnik az anyag bejuttatásában, bár a részecskeméretnek szintén fontos szerepe lehet. Elképzelhető, hogy későbbi kísérletekben kisebb dózis elég lehet olyan szöveti fémszintek eléréséhez, amit exponált emberekben figyeltek meg.

Az ólom idegrendszerben megfigyelt hatásai sok esetben a Ca²⁺ ionhoz való hasonlatosságával magyarázhatóak. Az expozíció után bekövetkező, enyhe, de szignifikáns eltolódás az ECoG spektrumában (a magasabb frekvenciasávok felé) származhat az acetilkolin (Ach) fokozott spontán felszabadulásából a felszálló retikuláris aktiváló rendszer idegvégződéseinek (az ólom preszinaptikus hatása miatt), vagy abból, hogy a glutamát

csökkent inaktivációja miatt a felszálló specifikus érzőpályák kollaterálisai erősebben ingerlik a formatio reticularist. A preszinaptikus végződéseknél az Pb^{2+} blokkolja a feszültség-függő Ca^{2+} csatornákat, ezáltal a befutó ingerületre kialakuló intracelluláris Ca^{2+} felhalmozódást és depolarizációt, és végeredményben a vezikulumok egyidejű kiürülését.

Ugyanakkor az Pb^{2+} ionok képesek bejutni a sejtbe az ioncsatornákon keresztül. Ott számos Ca függő folyamatot aktiválnak, aminek következtében a transzmitterek random felszabadulása valószínűbb lesz (14). A megváltozott corticalis aktivációnak szerepe lehet a kiváltott potenciálok megnövekedett latenciájában, mivel egy aktiváltabb állapotban lévő kéregre általában kevésbé intenzív kiváltott válaszok jellemzőek (15). Emellett az Pb ionok hatása a feszültségfüggő Ca csatornákra lassíthatja az akciós potenciál tovaterjedését, ami a perifériás idegrendszeren megfigyelt változásokban jelentkezhet, és ugyancsak hozzájárulhat a kérgi válasz megnövekedett latenciájához.

Az astrocita specifikus glutamát transzporter $GLT-1$ expressziója csökken Pb hatására(16) ami a glutamát csökkent clearance-ét eredményezi a szinaptikus részből. Ez egyrészt az afferens pályák mentén receptor deszenzitizációhoz vezet, másrészt excitotoxikus lehet az NMDA receptor (N-metil-D-aspartat, glutamát által aktivált receptor) aktiváció és az excesszív Ca beáramlás miatt. Ezzel egyidejűleg a megnövekedett glutamáterg aktivitás hozzájárulhat a feljebb már említett fokozott corticalis aktivációhoz is (17).

Jelen munkánkban számos olyan, a központi és perifériás idegrendszert érintő változást tapasztaltunk, melyek összefüggést mutattak az Pb expozíció mértékével. Ezen változások közül a szomatoszenzoros kiváltott potenciál latenciájának frekvencia-függése, valamint a farokideg vezetési sebessége szignifikánsan és dózis-függően változott a nano PbO kezelés hatására. A kapott eredmények alapján elmondhatjuk, hogy az alkalmazott metodológia jó modellnek bizonyult az inhalációs Pb expozíció ill. a nanorészecskék idegrendszerre gyakorolt hatásának tanulmányozására.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők köszönetet mondanak Koszta Józsefnek, Pálkás Editnek és Dr. Szőke Attilának (a MOL Magyar Olaj- és Gázipari Nyilvánosan Működő Részvénytársaság munkatársainak) a fémszint meghatározásért.

IRODALOM

REFERENCES

1. *Poór G., Mituszova M.*: Saturnine gout. *Bailliere's Clinical Rheumatology* 1989. 3. 51-61.
2. *Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J.*: Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives* 2005. 113. 823-839.
3. *Bradbury M.W., Deane R.*: Permeability of the blood-brain barrier to lead. *Neurotoxicology* 1993. 14. 131-136.
4. *Kreyling W.G., Semmler-Behnke M., Möller W.*: Ultrafine particle - lung interactions: does size matter? *Journal of Aerosol Medicine* 2006. 19. 74-83.
5. *Strohl K.P., Thomas A.J., St Jean P. et al.*: Ventilation and metabolism among rat strains. *Journal of Applied Physiology* 1997. 82. 317-323.
6. *Coffigny H., Thoreux-Manlay A., Pinon-Lataillade G. et al.*: Effects of lead poisoning of rats during pregnancy on the reproductive system and fertility of their offspring. *Human and Experimental Toxicology* 1994. 13. 241-246.
7. *Pinon-Lataillade G., Thoreux-Manlay A., Coffigny H. et al.*: The role of astroglia in Pb-exposed adult rat brain with respect to glutamate toxicity. *Toxicology* 2005. 212. 185-194.
8. *Nagymajtényi L., Schulz H., Papp A., Dési I.*: Behavioural and electrophysiological changes caused by subchronic lead exposure in rats. *Central European Journal of Occupational and Environmental Medicine* 1997. 3. 195-209.
9. *Wang J., Liu Y., Jiao F. et al.*: Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles. *Toxicology* 2008. 254. 82-90.
10. *Lundborg M., Eklund A., Lind B. et al.*: Dissolution of metals by human and rabbit alveolar macrophages. *British Journal of Industrial Medicine* 1985. 42. 642-645.
11. *Goldstein G.W., Asbury A.K., Diamond I.*: Pathogenesis of lead encephalopathy. Uptake of lead and reaction of brain capillaries. *Archives of Neurology* 1974. 31. 382-389.
12. *Jiang Y.M., Long L.L., Zhu X.Y. et al.*: Evidence for altered hippocampal volume and brain metabolites in workers occupationally exposed to lead: a study by magnetic resonance imaging and (1)H magnetic resonance spectroscopy. *Toxicology Letters* 2008. 181. 118-125.
13. *Lormphongs S., Morioka I., Miyai N. et al.*: Occupational health education and collaboration for reducing the risk of lead poisoning of workers in a battery manufacturing plant in Thailand. *Industrial Health* 2004. 42. 440-445.
14. *Suszkiew J.B.*: Presynaptic disruption of transmitter release by lead. *Neurotoxicology* 2004. 25. 599-604.
15. *Herz A., Fralng F., Niedner I., Färber G.*: Pharmacologically induced alterations of cortical and subcortical evoked potentials compared with physiological changes during the awake-sleep cycle in cats. In: *Cobb W, Morocutti C*, eds. *The Evoked Potentials*. Amsterdam: Elsevier, 1967. pp. 165-176.
16. *Struzynska L., Chalimoniuk M., Sulkowski G.*: The role of astroglia in Pb-exposed adult rat brain with respect to glutamate toxicity. *Toxicology* 2005. 212. 185-194.
17. *Fournier G.N., Materi L.M., Semba K., Rasmusson D.D.*: Cortical acetylcholine release and electroencephalogram activation evoked by ionotropic glutamate receptor agonists in the rat basal forebrain. *Neuroscience* 2004. 123. 785-792.