

## IN-VITRO BIOLOGICKÁ DOSTUPNOST RIZIKOVÝCH PRVKŮ Z INHALOVANÉHO MĚSTSKÉHO SEDIMENTUJÍCÍHO PRACHU

KATEŘINA KAŠPAROVSKÁ<sup>a,b</sup>, JIŘINA  
SZÁKOVÁ<sup>b</sup>, JIŘINA SYŠALOVÁ<sup>c</sup>, PAVEL  
TLUSTOŠ<sup>b</sup> a PETR SVOBODA<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Fyziologický ústav AV ČR, Videňská 1083, 142 20 Praha 4, <sup>b</sup> Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita, 165 21 Praha 6 – Suchbátka, <sup>c</sup> Laboratoř AAS, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6  
szakova@af.czu.cz

Došlo 8.2.11, přepracováno 6.2.12, přijato 8.3.12.

Klíčová slova: rizikové prvky, kontaminovaný sedimentující prach, inhalace, biologická dostupnost, Hatchův roztok, Gambleův roztok

### Úvod

Výsledky evropských publikovaných studií shrnujících dopad kontaminovaného sedimentujícího prachu a zejména dýchacích podílů (částic označovaných dle velikosti – v  $\mu\text{m}$  – částic jako  $\text{PM}_{10}$  a  $\text{PM}_{2,5}$ ) na lidské zdraví jsou velmi heterogenní. Ukazují ale jednoznačně na souvislost s rozvojem kardiovaskulárních a respiračních onemocnění<sup>1</sup>. Velmi frekventovanou a vhodnou metodou pro posouzení případných nepříznivých vlivů sedimentujícího prachu a s ním spojených polutantů na dýchací cesty je odběr a vyšetření bronchoalveolární tekutiny, tzv. bronchoalveolární laváž (BAL), kdy jsou dolní dýchací cesty a alveoly oplachovány pomocí speciálního bronchoskopu fyziologickým roztokem ohřátým na teplotu 37 °C (cit.<sup>2,3</sup>). Bargagli a spol.<sup>4</sup> studovali možnost využití přímého stanovení

obsahů Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, V a Zn v roztocích získaných metodou BAL pro posouzení míry projevů některých plicních onemocnění a označili ji za velmi slibnou. Zaznamenali např. pokles koncentrací Mn, Zn, Cr a Ni v BAL vzorcích pacientů s idiopatickou plicní fibrózou, která je charakterizována mimo jiné zvýšenou tvorbou volných radikálů a pokles koncentrací prvků byl připsán oxidativnímu stresu. Metoda je využívána i v modelových pokusech, kdy jsou laboratorní potkani a myši prostřednictvím dýchacího ústrojí exponováni chemickým prvkům<sup>5,6</sup>, prachovým částicím<sup>7</sup>, zplodinám vzniklým při svařování kovů<sup>8</sup>, výfukovým plynům<sup>9</sup> nebo kontaminovanému městskému prachu<sup>10</sup> a prachu uvolněnému průmyslovou činností<sup>11</sup>. Metoda je rovněž používána k detailnímu popisu mechanismu průniku některých rizikových prvků (Fe, Mn, Zn) epitelem plicních alveol a následným zdravotním komplikacím<sup>12,13</sup>.

Jako alternativu k těmto lékařským metodám je možno hodnotit biologickou dostupnost chemických prvků či jejich sloučenin na základě jejich rozpustnosti v roztocích simulujících složení různých tkáňových tekutin<sup>14</sup>. Známá je např. metoda postupné extrakce (tzv. „Physiologically Based Bioavailability Extraction Test“ PBET)<sup>15,16</sup>, která byla vyvinuta k hodnocení negativního dopadu půd ve vysoce kontaminovaných oblastech, kdy se testuje možný vstup rizikových prvků do organismu člověka neúmyslným požitím půdy. Postup zařazuje pro extrakci vzorku půdy postupně činidla, která simulují procesy v ústní dutině, v žaludku, ve dvanáctníku a v tenkém střevě. Pro hodnocení dostupnosti chemických prvků dýchacím ústrojím se nejčastěji využívají tzv. Gambleův roztok<sup>17</sup> a Hatchův roztok<sup>18</sup>. Jejich složení shrnuje tabulka I. Gambleův roztok simuluje intersticiální plicní tekutinu, Hatchův roztok je bližší tekutině produkované epitelem dolních cest dýchacích<sup>8</sup>.

Tyto *in vitro* metody byly aplikovány např. pro stanovení biodostupných podílů prvků obsažených ve zplodinách vzniklých při svařování kovů zachycených na filtrech z PVC<sup>8</sup>, nebo pro posouzení biodostupnosti platinových kovů v městském prachu odebraném na frekventované komunikaci<sup>10</sup>. V našem experimentu byly tyto roztoky použity pro odhad biodostupného podílu vybraných rizikových prvků Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb a Zn

Tabulka I

Složení a pH použitých extrakčních médií

Extrakční médium	pH	Obsah složek v 1 dm <sup>3</sup> deionizované vody
Gambleův roztok	7,4	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O (0,2033g), NaCl (6,0193 g), KCl (0,2982 g), Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,1420 g), Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,0710g), CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O (0,3676g), CH <sub>3</sub> COONa · 3 H <sub>2</sub> O (0,9526g), NaHCO <sub>3</sub> (2,6043 g), C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> OH(COOH) <sub>2</sub> COONa (0,0970 g)
Hatchův roztok	7,4	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O (0,2251 g), MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O (0,21 g), MgSO <sub>4</sub> (0,0342 g), KCl (0,37g), KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,03 g), NaHCO <sub>3</sub> (2,27 g), NaCl (7,0 g), Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,1196 g), D-glukosa (1,0 g), fosfatidylcholin (10 g), a-tokoferol (0,001 g), kyselina močová (0,025 g), sérový albumin (10 g), lysozym (2,5 g), apo-transferrin (0,2 g), kyselina askorbová (0,05 g), glutathion (0,05 g)

v homogenním vzorku kontaminovaného městského prachu v závislosti na době inkubace.

## Materiál a metody

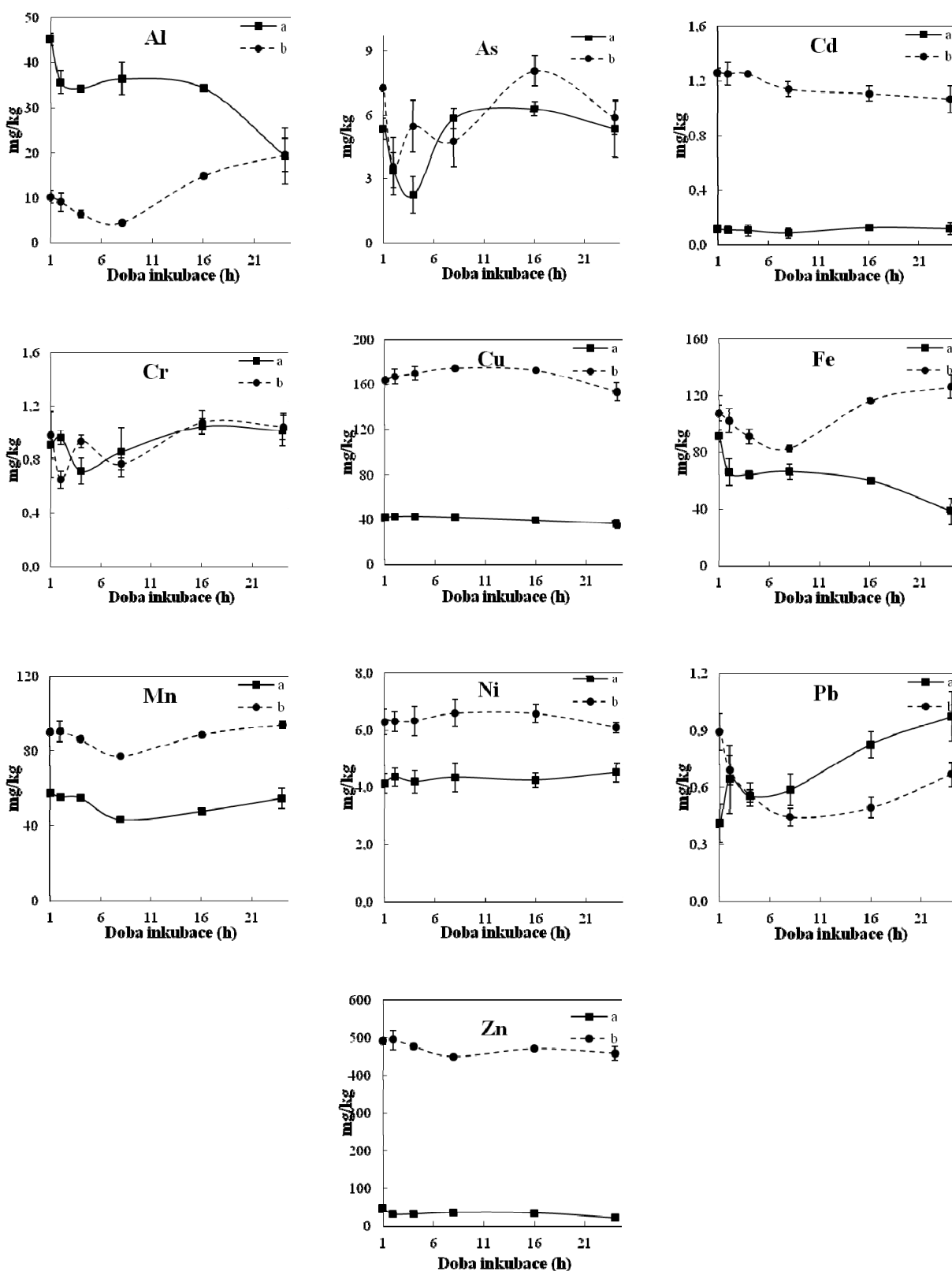
Vzorek prachu byl odebrán ze vzduchotechniky Pražského kulturního centra (PKC), které stojí vedle magistrály, i když stále ještě v centru pražské aglomerace. Tato lokalita je tudíž vystavena extrémní dopravní automobilové zátěži, která se odráží ve složení zachyceného prachu na filtrech vzduchotechniky. Hrubé částice a příměsi byly odstraněny proséváním přes síto s velikostí ok 2 mm; další frakcionace podle velikosti zrn pak následovala proséváním přes síta s velikostí ok 0,507 mm, 0,119 mm, 0,063 mm. Pro experiment pak byla použita nejjemnější frakce <0,063 mm, která zahrnuje i dýchací podíly. Stanovení celkového obsahu prvků bylo provedeno po mokřím rozkladu 20 mg vzorku prachu za zvýšeného tlaku s mikrovlnným ohřevem ve směsi HNO<sub>3</sub>, HF a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5:1:1). Pro kontrolu správnosti výsledků byl použit referenční materiál SRM 1648 Urban Particulate Matter (NIST, USA). Obsahy Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb a Zn byly stanoveny metodou optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES, Varian, VistaPro, Australia). Detailně je metoda stanovení popsána v naší předchozí práci<sup>19</sup>. Výsledky byly potvrzeny srovnávací analýzou metodami INAA a PIXE, jak popisují ve své práci Sysalová a spol.<sup>20</sup>

Vzorky prachu byly extrahovány dle následujícího postupu: 0,5 g vzorku prachu bylo naváženo do centrifugační nádoby, zalito 50 ml připraveného Hatchova nebo Gambleova roztoku (tab. I) a inkubováno za stálého protřepávání při 30 otáčkách za minutu ve vodní lázni Memmert WNE 22 s třepacím zařízením Memmert M00 14/22 při teplotě 37 °C. Inkubace probíhala vždy ve 3 opakováních po dobu 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 a 24 hodin. Pro odstředování extraktů byla použita centrifuga Hettich Universal 320 R. Reakční směs byla odstředěna při 3000 otáčkách za minutu po dobu 10 min a supernatanty pak byly uchovány při 6 °C až do doby měření. Všechny užití chemikálie byly v maximální dostupné čistotě (Analytika a Lach-Ner Ltd., Česká republika), extrakční roztoky byly připravovány vždy čerstvé. Obsah Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb a Zn v připravených extraktech byl stanoven optickou emisní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP OES) s axiální orientací plazmové hlavice na přístroji Varian VistaPro (Varian, Austrálie). Intenzita signálu byla vyhodnocována na následujících vlnových délkách:  $\lambda = 308,2$  nm pro Al,  $\lambda = 188,9$  nm pro As,  $\lambda = 214,4$  nm pro Cd,  $\lambda = 205,6$  nm pro Cr,  $\lambda = 327,4$  nm pro Cu,  $\lambda = 238,3$  nm pro Fe,  $\lambda = 257,6$  nm pro Mn,  $\lambda = 231,6$  nm pro Ni,  $\lambda = 220,4$  nm pro Pb,  $\lambda = 206,2$  nm pro Zn. Pro vyhodnocování signálu byla použita metoda přidavku standardu.

## Výsledky a diskuse

Celkové obsahy prvků ve vzorku prachu byly následující: Al 36695±664 mg kg<sup>-1</sup>, As 24,1±0,2 mg kg<sup>-1</sup>, Cd 2,64±0,05 mg kg<sup>-1</sup>, Cr 164±4 mg kg<sup>-1</sup>, Cu 434±3 mg kg<sup>-1</sup>, Fe 37 956±3 mg kg<sup>-1</sup>, Mn 630±6 mg kg<sup>-1</sup>, Ni 57,8±0,9 mg kg<sup>-1</sup>, Pb 106±2 mg kg<sup>-1</sup>, Zn 1493±41 mg kg<sup>-1</sup>. Extrahovatelné obsahy prvků jednotlivými činidly v závislosti na době inkubace znázorňuje obr. 1. Je zřejmé, že extrahovatelnost jednotlivých prvků se liší dle použitého činidla, doby inkubace i dle chemických vlastností jednotlivých prvků. Zatímco v případě As a Cr byla extrahovatelná frakce srovnatelná u obou činidel, u ostatních sledovaných prvků byly vyšší extrahovatelné podíly zaznamenány při použití Hatchova roztoku, tedy simulovanou tekutinou produkovanou epitelem dolních cest dýchacích. Extrahovatelné podíly Al, Cr, Pb a Fe byly velmi nízké a nepřekročily 1 % celkového obsahu. Při použití Gambleova roztoku byly nejvyšší extrahovatelné podíly zjištěny u As, kdy se v závislosti na době inkubace pohybovaly v rozmezí 10–24 % celkového obsahu tohoto prvku. Uvolnitelnost dalších prvků pak dosahovala jednotek procent a klesala v pořadí Cu > Mn > Ni > Cd > Zn. Hatchův roztok uvolňoval nejvíce Cd (40–48 % celkového obsahu) a následovaly v sestupném pořadí Cu (35–40 %), Zn (30 až 33 %), As (15–34 %), Mn (12–15 %) a Ni (9–11 %). Vysoká účinnost tohoto extraktantu ve srovnání s Gambleovým roztokem (zvláště v případě Cd, Cu a Zn) je pravděpodobně způsobena přítomností organických složek Hatchova roztoku (zejména glutathionu), které mohou s uvedenými prvky tvořit komplexy. Berlinger a spol.<sup>8</sup> rovněž zaznamenali vyšší uvolnitelnost Fe, Mn, Cr, Ni z PVC filtrů se zplodinami vznikajícími při svařování kovů pomocí Hatchova roztoku. Procento biologicky dostupného Fe a Cr bylo ale vzhledem k odlišnému původu i složení analyzovaných vzorků v jejich případě až řádově vyšší. Tito autoři také sledovali závislost extrahovatelného podílu prvků na době inkubace, která se podobně jako v našem případě lišila dle jednotlivých prvků i použitých činidel. Zatímco Berlinger a spol.<sup>8</sup> zaznamenali ve většině případů nejvyšší extrahovatelné obsahy prvků po 24 hodinách inkubace (zejména při použití Hatchova roztoku, Gambleův roztok dával nejednoznačné výsledky), naše data potvrzují tento trend pouze v případě Mn a Pb. Obr. 1 dokládá u většiny prvků nejvyšší extrahovatelné podíly v rozmezí mezi 8. a 16. hodinou inkubace. Po delší době inkubace pak u našich vzorků musíme uvažovat o případné readsorpci prvků na matici vzorku.

Výsledky můžeme porovnat s *in vitro* hodnocením potenciální biologické dostupnosti některých prvků trávicím traktem s použitím již zmíněné metody PBET<sup>15</sup>. Tuto metodu aplikovali Tremlová a spol.<sup>21</sup> u totožného vzorku prachu a extrahovatelné obsahy prvků představovaly u simulované žaludeční šťávy 18 % As, 93 % Cd, 6 % Fe a 74 % Zn. V případě simulované pankreatické šťávy se pak jednalo o 20 % As, 40 % Cd, 8 % Fe a 48 % Zn. Vysoká extrahovatelnost Cd a Zn je v případě žaludeční šťávy způsobena nízkým pH extraktantu (pH 2,5) a po změně



Obr. 1. Obsahy prvků extrahovatelné Gambleovým (a) a Hatchovým (b) roztokem ze vzorku kontaminovaného městského prachu

pH na hodnotu 7 u pankreatické šťávy došlo k readsorpci části uvolněných prvků na matici vzorku. Lze tedy shrnout, že pulmonárně dostupné podíly As, Cd a Zn stanovené ve vzorku městského prachu s využitím Hatchova roztoku jsou porovnatelné s podíly těchto prvků uvolnitelnými pankreatickou šťávou, zatímco extrahovatelnost Fe Hatchovým roztokem je mnohem nižší.

Zdá se tedy, že ze sledovaných prvků zasluhuje největší pozornost zinek, který se nachází ve vzorku prachu ve vysokých koncentracích ve srovnání např. s běžnými obsahy tohoto prvku v půdách a u něhož byla zároveň zjištěna vysoká potenciální biologická dostupnost. Adamson a spol.<sup>21</sup> hodnotili u laboratorních potkanů vliv rizikových prvků inhalovaných se vzorkem atmosférického prachu na případné zánětlivé změny na plicích. Po třech dnech expozice bylo zjištěno, že pouze zinek vyvolal zvýšení počtu zánětlivých buněk a obsahu proteinů v BAL vzorcích. Další sledované prvky, tedy Cu, Fe, Al, Pb a Ni, podobné změny nevyvolaly. Totožná změna jako v případě zinku ale byla pozorována, pokud byla pokusná zvířata exponována všem sledovaným prvkům současně včetně zinku. Expozice zvířat všem prvkům současně kromě zinku vedla jen k nevýznamným změnám na plicích. Autoři se domnívají, že riziko v případě zinku vychází z vysokého obsahu tohoto prvku v prachu v kombinaci s jeho vysokou mobilitou, která je v tomto případě rozhodující. Gilmour a spol.<sup>12</sup> pak u potkanů exponovaných zinku dýchacími cestami zaznamenali v rozmezí 1 až 24 hodin po skončení expozice zvýšení obsahu zinku v krevní plazmě o 20 %. Zjistili také průkazné snížení krevní srážlivosti u zvířat exponovaných zinku. Wallenborn a spol.<sup>22</sup> pak zaznamenali u potkanů kardiotoxicitu prvků přijatých dýchacími cestami, zejména Zn a Ni.

## Závěr

Lze shrnout, že ze sledovaných prvků obsažených v kontaminovaném městském prachu představuje při inhalaci tohoto prachu potenciální zdravotní riziko právě zinek, jak naznačuje i náš experiment. Naproti tomu olovo, které patří k nejčastěji studovaným prvkům v sedimentujícím prachu, je velmi slabě uvolnitelné simulovanou plicní tekutinou a jeho zdravotní riziko je v tomto případě nízké.

Naše výsledky naznačují, že *in vitro* experimenty simulující biologickou dostupnost rizikových prvků v kontaminovaném sedimentujícím prachu mohou být jednoduchou a snadno reprodukovatelnou alternativou nebo doplňkem klasických klinických testů využívajících např. metodu BAL. Výsledky simulovaných *in vitro* testů mohou vést při vhodné volbě extrakčního média a experimentálních podmínek ke kvalitativnímu odhadu potenciálního rizika prvků obsažených v městském prachu.

*Problematika byla řešena v rámci výzkumného projektu GA ČR 521/09/1150.*

## LITERATURA

- Pelucchi C., Negri E., Gallus S., Boffetta P., Tramacere I., La Vecchia C.: *Toxicol. Appl. Pharm.* 147, 399 (1997).
- Broadus C., Dake M. D., Stulbarg M. S.: *Ann. Intern. Med.* 102, 747 (1985).
- Entzian P., Barth J.: *Dtsch. Med. Wochenschr.* 115, 663 (1990).
- Bargagli E., Monaci F., Bianchi N., Bucci C., Rottoli P.: *Biol. Trace Elem. Res.* 124, 225 (2008).
- Morgan D. L., Shines C. J., Jeter S. P., Blazka M. E., Elwell M. R., Wilson R. E., Ward S. M., Price H. C., Moskowitz P. D.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 147, 399 (1997).
- Hirano S., Ebihara H., Sakai S., Kodama N., Suzuki K. T.: *Arch. Toxicol.* 67, 312 (1993).
- Kodavanti U. P., Mebane R., Ledbetter A., Krantz T., McGee J., Jackson M. C., Walsh L., Hilliard H., Chen B.Y., Richards J., Costa D. L.: *Toxicol. Sci.* 54, 441 (2000).
- Berlinger B., Ellingsen D. G., Náray M., Záray G., Thomassen Y.: *J. Environ. Monit.* 10, 1448 (2008).
- Sunil V. R., Patel K. J., Mainelis G., Turpin B. J., Ridgely S., Laumbach R. J., Kipen H. M., Nazarenko Y., Veleeparambil M., Gow A. J., Laskin J. D., Laskin D. L.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 241, 283 (2009).
- Colombo C., Monhemius A. J., Plant J. A.: *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 71, 722 (2008).
- Hutchison G. R., Brown D. M., Hibbs L. R., Heal M. R., Donaldson K., Maynard R. L., Monaghan M., Nicholl A. Stone V.: *Respir. Res.* 6, 43 (2005).
- Gilmour P. S., Nyska A., Schladweiler M. C., McGee J. K., Wallenborn J. G., Richards J. H., Kodavanti U. P.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 211, 41 (2006).
- Heilig E. A., Thompson K. J., Molina R. M., Ivanov A. R., Brain J. D., Wessling-Resnick M.: *Am. J. Physiol.: Lung Cell. Mol. Physiol.* 290, L1247 (2006).
- Ellickson K. M., Meeker R. J., Gallo M. A., Buckley B. T., Lioy P. J.: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 128 (2001).
- Ruby M. V., Davis A., Schoof R., Berle S., Sellstone C. M.: *Environ. Sci. Technol.* 30, 422 (1996).
- Oomen A. G., Rompelberg C. J. M., Van de Kamp E., Pereboom D. P. K. H., De Zwart L. L., Sips A. J. A. M.: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 13 (2004).
- Moss O.: *Health Phys.* 36, 1209 (1979).
- Hatch G. E., v knize: Parent R. A. (ed.): *Comparative Biology of the Normal Lung*, str. 617. CRC Press, Boca Raton 1992.
- Sysalová J., Száková J.: *Chem. Pap.* 61, 271 (2007).
- Sysalová J., Kučera J., Kotlík B., Havránek V.: *Anal. Bioanal. Chem.* 373, 195 (2002).
- Adamson I. Y. R., Prieditis H., Hedgecock C., Vincent R.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 166, 111 (2000).
- Wallenborn J. G., Schladweiler M. J., Richards J. H., Kodavanti U. P.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 241, 71 (2009).

**K. Kašparovská<sup>a,b</sup>, J. Száková<sup>b</sup>, J. Sysalová<sup>c</sup>, P. Tlustoš<sup>b</sup>, and P. Svoboda<sup>a</sup>** (*<sup>a</sup>Institute of Physiology, Academy of Science of the Czech Republic, Prague, <sup>b</sup>Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences, Prague; <sup>c</sup>AAS Laboratory, Institute of Chemical Technology, Prague*): ***In-vitro* Bioavailability of Hazardous Elements from Inhaled Urban Particulate Matter**

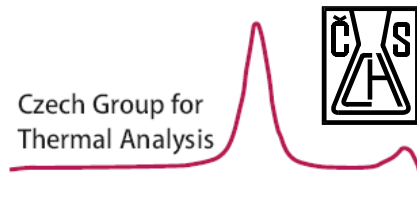
An *in vitro* test simulating release of elements from inhaled particles using artificial lung fluids was used in

estimation of bioavailability of hazardous elements (Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, and Zn). The extractable Al, Cr, Pb, and Fe did not exceed 1 %. The mobility of the elements was affected by the extractants used, incubation time and/or element properties. Whereas no significant differences between the extractants were found for As and Cr, higher extractability of the other elements was observed depending on the artificial lung fluid.

**4<sup>th</sup> Joint Czech-Hungarian-Polish-Slovak Thermoanalytical Conference,  
24.6.-27.6.2013,  
Pardubice, Czech Republic**

**WWW.THERMAL-ANALYSIS.CZ**

Czech Group for  
Thermal Analysis



**HISTORY AND SCOPE**

The 4<sup>th</sup> Joint Czech-Hungarian-Polish-Slovak Thermoanalytical Conference is another in a series of meetings of the four national thermoanalytical groups – Czech, Hungary, Polish and Slovak.

The conference originated within 2005–2006 when the Heads of national thermoanalytical groups decided to merge their local conferences into an international one with a higher scientific impact.

After Sopron (Hungary, 2007), Zakopane (Poland, 2009) and Stará Lesná (High Tatras – Slovakia, 2011), in 2013 the conference is held on 24–27 June 2013 in Pardubice (Czech Republic).

The 4<sup>th</sup> joint thermoanalytical conference of four states is going to be organized by Czech Group for Thermal Analysis (Czech Chemical Society) and University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology.

**TOPICS**

- TA and inorganic, organic and biological materials;
- kinetics and reactivity of solids;
- solution calorimetry;
- food systems;
- new solutions in theory and instrumentations.

...

Any other topics are welcome.

**GENERAL INFORMATION**

Date: 24th to 27th June 2013.

Language: English.

Presentations: plenary lectures (40 min), oral presentations (25 min), posters (90×110 cm).

Registration, full text submission and payment deadline: **31st March 2013**.

*The accepted contributions can be published in the Special Issue of Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.*

**More information:** <http://www.thermal-analysis.cz>