

**Tartu Ülikool
Tervishoiu instituut**

**PLII TOIME KÄITUMISELE
JA AJU NEUROGENEESILE
Eksperimentaaluuring**

Magistritöö rahvatervishoius

Monika Jürgenson

**Juhendajad : Aleksander Zharkovski, PhD
TÜ Farmakoloogia instituut, professor**

**Eda Merisalu, PhD
TÜ Tervishoiu instituut, Keskkonna-ja
töötervishoiu õppetool, dotsent**

Tartu 2005

Magistritöö teostati Tartu Ülikooli Tervishoiu instituudis ning Tartu Ülikooli Farmakoloogia instituudis.

Tartu Ülikooli kraadinõukogu otsustas 31. mail 2005. a. lubada väitekiri rahvatervise teadusmagistrikraadi kaitsmisele.

Oponent: Vallo Volke, meditsiinidoktor, Tartu Ülikool Füsioloogia instituut, vanemteadur

Kaitsmine: 14. juunil 2005

© Tartu Ülikool, 2005
Tartumaa Trükikoda
Betooni 9 Tartu 51014

ISSN 1406-6017
ISBN 9985-4-0445-9 (trükis)
ISBN 9985-4-0446-7 (PDF)

SISUKORD

MAGISTRITÖÖ MATERJALIDE PUBLITSEERITUS.....	5
KASUTATUD TÄHISED JA LÜHENDID.....	6
SISUKOKKUVÕTE.....	7
1 SISSEJUHATUS.....	8
2 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	9
2.1 Keskkonnast tulenev pliisaaste ja mõju inimesele.....	9
2.1.1 Vesi.....	9
2.1.2 Õhk.....	9
2.1.3 Pinnas.....	10
2.1.4 Olukord Eestis.....	11
2.2 Plii jagunemine organismis.....	14
2.3 Pliimürgistuste nähud.....	15
2.3.1 Äge mürgistus.....	15
2.3.2 Krooniline mürgistus.....	15
2.4 Pliimürgistuste avaldumine lastel.....	16
2.4.1 Kroonilise mürgistuse mõju laste arengule.....	17
2.5 Plii põhjustatud morfoloogilised muutused ajus ja selle mõju käitumisele.....	18
2.5.1 Neurogenees ja selle roll ajus.....	20
3 UURIMISTÖÖ EESMÄRGID.....	22
4 MATERJAL JA MEETODID.....	23
4.1 Katseloomad ja plii manustamise skeem.....	23
4.2 Pliikontsentratsiooni määramine.....	23
4.2.1 Pliikontsentratsiooni määramine veres ja kudedes.....	23
4.2.2 Pliikontsentratsiooni määramise skeem.....	24
4.2.3 Vere ja kudede töötlemine enne pliikontsentratsiooni määramist.....	24
4.3 Käitumiskatsed.....	24
4.3.1 Lokomotoorse aktiivsuse katse.....	24
4.3.2 Pluss-puuri katse.....	25
4.3.3 Kontekstuaalse mälu katse.....	25
4.4 Neurogeneesi katse.....	26
4.4.1 Immunohistokeemia.....	27

4.4.2	Rakkude lugemine	28
4.4.3	BrdU-positiivsete rakkude fenotüübi määramine	29
4.5	Andmeanalüüs.....	29
5	TULEMUSED	30
5.1	Loomade kehakaal ja üldine toitumus	30
5.2	Pliikontsentratsioonid veres ja ajukoes.....	31
5.3	Plii sisaldus kontroll-loomade ja pliidi saanud loomade teistes organites.....	32
5.4	Käitumine.....	33
5.4.1	Lokomotoorne aktiivsus.....	33
5.4.2	Loomade käitumine pluss-puuris.....	34
5.4.3	Kontekstuaalne mälu.....	36
5.5	Neurogenees.....	37
5.5.1	Proliferatsioon.....	37
5.5.2	Rakkude elulemus.....	37
5.5.3	Rakkude diferentseerumine	39
6	ARUTELU.....	40
7	KOKKUVÕTE JA JÄRELDUSED.....	44
8	KASUTATUD KIRJANDUS.....	46
	SUMMARY.....	55
	TÄNU.....	56
	AVALDAMISELE SAADETUD PUBLIKATSIOON.....	57
	AUTORI ELULUGU.....	82

MAGISTRITÖÖ MATERJALIDE PUBLITSEERITUS

Magistritöös esitatud materjalid on esitatud avaldamiseks:

1. Zharkovsky A., Jaako-Movits K., Zharkovsky T., Romantchik O., Jurgenson M., Merisalu E., Heidmets L.-T., 'Lead exposure during postnatal period impairs contextual fear conditioning and reduces adult hippocampal neurogenesis in the rat brain', Submitted 05.05.2005, *International Journal of Developmental Neuroscience (Elsevier Editorial System)*
2. Heidmets L.-T., Zharkovsky T., Jurgenson M., Jaako-Movits K., Zharkovsky A., 'Early post-natal, low-level lead exposure increases the number of PSA-NCAM expressing cells in the gyrus dentatus of adult rat hippocampus', Accepted for publication 01.06.2005, *Neurotoxicology (Elsevier Editorial System)*

KASUTATUD TÄHISED JA LÜHENDID

Kasutatud lühendid

BrdU	5-bromo-2'-deoksüüridiin
GFAP	gliaalne fibrillaarne happeline valk (glial fibrillary acidic protein)
NMDA	N-metüül-D-aspartaat
Tuj1	β -tubuliin
DAB	3,3'-diaminobensidiin
V	ruumala
A _p	punktide paiknevuse tihedus
Σ ·Q	loetud punktide summa
WHO	Maailma Tervishoiuorganisatsioon
RTL	Riigi Teataja Lisa

SISUKOKKUVÕTE

Plii on metall, mis on aktiivse inimtegevuse tagajärjel levinud kõikjale elukeskkonda. Kuigi ohutuks pliitasemeks igas vanuses inimeste veres peetakse väärtust 10 µg/dl, on viimased uuringud näidanud, et selline pliikontsentratsioon organismis mõjutab oluliselt väikelaste arengut ja käitumist - halveneb mälu ja õppimisvõime (Canfield jt, 2003, Chiodo jt, 2004; Shen jt, 2001).

Et leida seoseid käitumishäirete ja ajus toimuvate muutuste vahel, viidi antud uuringus läbi katse, mille käigus manustati varases arengueas rottidele (1.–30. elupäevani) 0,2 % pliiatsetaadilahust. Kontroll-loomadele anti samal ajal joogiks destilleeritud vett. Täiskasvanud loomadele manustati 60. ja 80. elupäeval BrdU – markerit, mis võimaldab märgistada uusi arenevaid neuroneid. Uuriti ka uute tekkivate rakkude elulemust ja fenotüüpi. Samal ajal viidi läbi ka käitumiskatsed, kus vaadeldi pliidi saanud loomade ja kontroll-loomade käitumiserinevusi. Käitumuslikud muutused fikseeriti seejuures loomadel, kelle pliiatsetaadi veres katsete toimumise ajaks oli langenud kontrollgrupiga sarnasele tasemele.

Käitumiskatsete tulemused näitasid pliidi saanud loomadel pärast plii manustamise lõppemist suurenenud rahutust ja vähenenud kontekstuaalset mälu. Siit ilmneb, et plii toime on kauakestev ja varases postnataalses perioodis saadud väikesed pliiikogused mõjutavad täiskasvanud loomade käitumist.

Ühtlasi ilmnes, et varases arengueas pliidi saanud loomadel oli oluliselt vähenenud uute rakkude proliferatsioon. Katse tulemusel ilmnes samuti, et täiskasvanud neuronite markeri kalbindiiniga märgistatud rakke oli pliidi saanud loomadel oluliselt vähem kui kontroll-loomadel. Samal ajal oli astroglia ning noorte, mittetäielikult väljaarenenud rakkude hulk pliidi saanud loomadel kõrgem kui kontroll-loomadel.

Antud katse tulemused kinnitavad, et varases arengueas organismi sattunud väikesed pliiikogused vähendavad ajus toimuvat neurogeneesi, mis võib kahjustada hipokampaalset funktsioneerimist ja olla üheks käitumishäirete tekkepõhjuseks täiskasvanueas.

1 SISSEJUHATUS

Keskkonnast tuleneva saaste globaalne suurenemine tõstab esile keskkonnas püsivate elementide ja inimese terviseriski küsimuse. Plii on üks paljudest keskkonda sattunud raskmetallidest, mille aktuaalsus on viimastel aastatel terviseuuringute tulemusel taas tõusnud. Nimelt on leitud, et väikestes kogustes organismi sattudes plii akumuleerub ja põhjustab elanikkonnal (eelkõige lastel) tervise – ja käitumishäireid. Seetõttu tuleb pliist tulenevat terviseriski vaadelda tähtsa rahvatervise probleemina.

Keskkonnaseire on näidanud, et aktiivse inimtegevuse tagajärjel on plii levinud tänaseks kõikjale elukeskkonda. Kuigi on tehtud mitmeid piiranguid õhku sattuva pliihulga suhtes, ei ole välistatud nii tööstusliku kui ka loodusliku päritoluga plii sattumine keskkonda (Lippmaa ja Pihlak, 1992; Pihlak, 1994; Eesti Geoloogiline kaart, 2003; Riiklik Keskkonnaseire programm, 2003).

Veel kaks aastakümnet tagasi oli pliist tulenev keskkonnaoht nii arenenud kui ka arenevate riikide probleemiks. Kuid seoses teadlikkuse tõusuga arenenud riikides ja plii keskkonda sattumise vähendamise programmidega on olukord paranenud. Siiski on oluline teadvustada, et väikeste pliikoguste sattumine elusorganismi on tänapäeval peaaegu vältimatu.

Ohutuks pliitasemeks veres peetakse hetkel igas vanuses inimestel väärtust 10 µg/dl, kuid viimased uurimused näitavad, et selline pliikontsentratsioon organismis mõjutab siiski oluliselt väikelaste arengut. Tekivad käitumuslikud häired, halveneb mälu ja õppimisvõime (Canfield jt, 2003). Uuringud kinnitavad, et plii sattumine lapse organismi varases arengueas võib mõjutada lapse käitumist ja arengut ka täiskasvanueas (Chiodo jt, 2004; Shen jt, 2001). Samuti on leitud olulisi seoseid noorte kriminogeense käitumise ja plii sisalduse vahel luukoes (Needelmann jt., 2002).

Seetõttu on oluline selgitada madalatest pliikontsentratsioonidest tulenevate käitumishäirete tekkepõhjused, teadvustada elanikkonda plii ohtlikust toimest ja leida võimalused pliist tuleneva terviseriski vähendamiseks.

2 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

2.1 Keskkonnast tulenev pliisaaste ja mõju inimesele

Pliid võib sattuda atmosfääri õhku nii tööstusliku produktina kui ka inimese elutegevuse käigus (liiklussaaste, jäätmekäitlus). Pliid võib esineda nii looduslikes pinnakihtides kui ka põhjavetes, see võib akumul eeruda taimedesse ja loomadesse. Inimene saab pliid nii joogiveest, õhust ja toidust.

2.1.1 Vesi

Peamisteks pliiallikateks joogivee saastumisel on vanade torustike liitekohad, kus on kasutatud plii sulameid. Torustikest plii vabanemine sõltub vee kloriidide ja lahustunud hapniku sisaldusest, pH-st, temperatuurist, vee karedusest, torustiku pikkusest, jootekohtade arvust ja vee seismise ajast torustikus. Pehme, kergelt happeline vesi on väga hea pliiühendite lahusti. Seetõttu võib uute vasktorustike puhul vee Pb sisaldus torustikus olla just hommikuti kõrge – ulatudes 76–282 µg/l (Cuenot jt, 2005).

On raske hinnata üheselt veesaaste võimalusi, kuna isegi ühe veesüsteemi eri osades võib olenevalt torustikust vee plii sisaldus oluliselt varieeruda. Arvestades, et keskmiselt inime ne päevas 2 liitrit vett, võib päevane doos joogiveest tulenevalt olla 10–20 µg kuni 1 mg pliid (WHO, 1984).

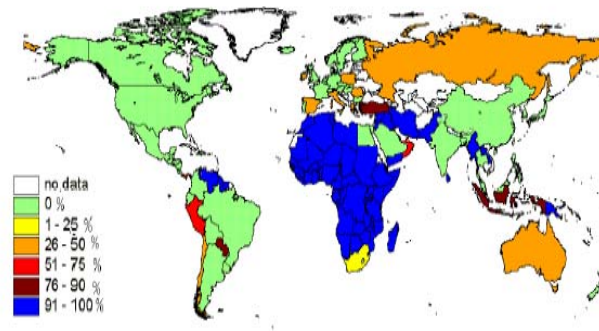
Seoses teadlikkuse tõusuga on joogivees lubatud plii kontsentratsioone pidevalt vähendatud. Normatiivi, mis sätestas plii lubatud kontsentratsiooniks 1980. aastal 30 µg/l, on tänapäeval vähendatud tasemeni 10 µg/l (WHO, 1993; RTL, 2001).

2.1.2 Õhk

Selgitamaks, kui palju satub pliid atmosfääri ilma inimtegevuseta, on teostatud uuringuid, kus eesmärgiks oli hinnata plii looduslikku atmosfäärisaastet eelajaloolisel ajal võrreldes tänapäevaga. Uuringus leiti, et eelajaloolisel ajal võis maa atmosfääri sattuda pliid silikaattolmust ligikaudu 2000 t Pb/aastas, vulkaanilisest tegevusest umbes 1500 t Pb/aastas ja umbes 500 t Pb/aastas mereveest ning vihmast (Ng ja Patterson, 1981).

Tänapäeval satub pliid atmosfääri palju kordi rohkem. Antropogeense tegevuse tagajärjel keskkonda sattuva plii osas tuleb mainida eelkõige tööstusettevõtteid ja keemiatehaseid, mis paiskavad tolmu ja aerosoolidena õhku mitmesuguseid pliiühendeid.

1980-1990. a. kasutati pliid laialdaselt autokütustes. Viimase 10-20 aasta jooksul on arenenud riigid piiranud pliid sisaldavate kütuste kasutamist ja sellest tulenevalt on ka õhu kaudu saadavad pliiühendid vähenenud oluliselt. Piirkondades, kus kasutatakse pliiühendeid, võib aga pliiühendite kontsentratsioon õhus endiselt ulatuda $3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (WHO, 2001). Nagu näitavad läbiviidud uuringud, on sellisteks piirkondadeks arengumaad, kus endiselt kasutatakse laialdaselt pliid sisaldavaid kütuseid (joonis 1).



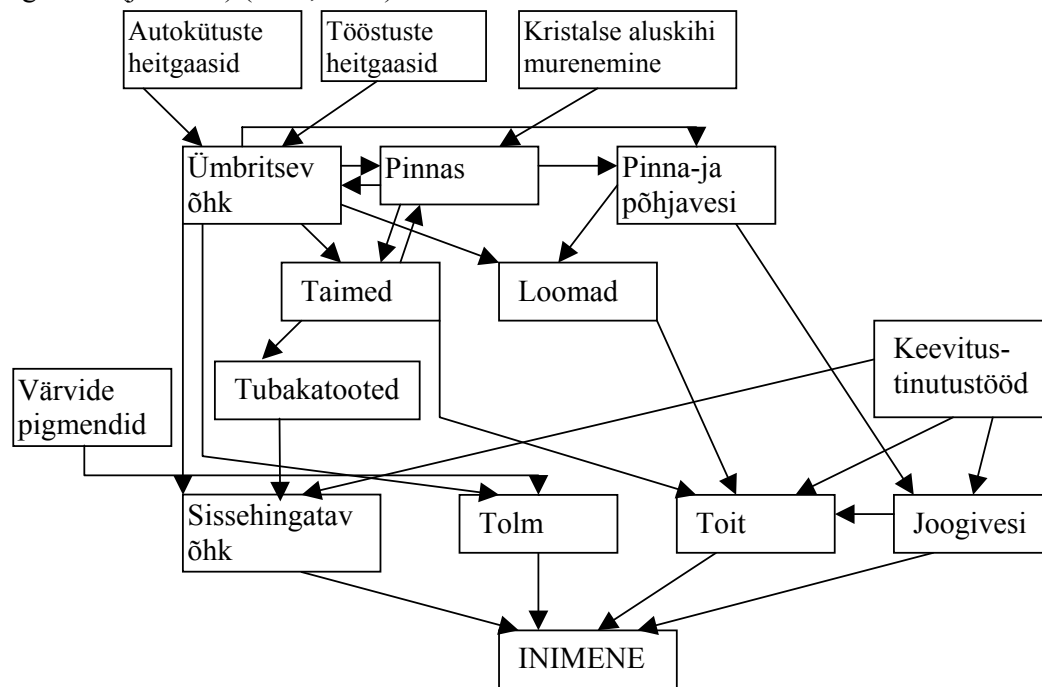
Joonis 1. Pliid sisaldava autokütuse hulk kogukütusest (Walsh, 2001)

2.1.3 Pinnas

Normaalseks loetakse pliiühendite kontsentratsiooni elutsooni pinnases $50\text{--}300 \text{ mg}/\text{kg}$ ja tööstustsooni pinnases kuni $600 \text{ mg}/\text{kg}$ (RTL, 2004). Pinnases sisalduva plii kogus sõltub nii sademetes kui ka õhus sisalduvast pliiühendist ja samuti sademete hulgast ning jaotusest. Leitud on, et vahetult metallisulatustehaste kõrval võib pliiühendite sisaldus pinnases olla koguni üle $1000 \text{ mg}/\text{kg}$ (Petrosjan jt, 2003). Siinkohal tuleb ära märkida, et tootmisest sõltuv pinnasereostus ongi tõenäolisem just kõrge tootmisaktiivsusega piirkondades. Nii on leitud kõrgemat pliiühendite sisaldust pinnases metallitoodete tehaste kõrval, näiteks Rootsis ($920 \text{ mg}/\text{kg}$) (Lin jt, 1997), Hiinas ($991 \text{ mg}/\text{kg}$) (Cui jt, 2004), aga ka Saksamaal, Prantsusmaal ja mujal.

Tiheda asustusega linnades on pliisaaste kõrgem kui hõredama asustusega asulates. Suurlinnade magistraalteede äärses pinnases leitud pliikontsentratsioonid on ulatunud olenevalt kiirteede liiklustihedusest 105–554 mg/kg (Sezgin jt, 2003), ulatudes mõnikord isegi 1088 mg/kg (Chirenje jt, 2004).

Kokkuvõtlikult võib vaadelda pliiallikaid ja sellest tulenevat ekspositsiooni inimesele järgmiselt (joonis 2) (EPA, 1986):



Joonis 2. Pliisaaste allikad keskkonnas

2.1.4 Olukord Eestis

Eestis on joogiveest leitud pliikontsentratsioonid olenevalt asukohast erinevad, jäädes enamasti oluliselt alla lubatud piirkontsentratsiooni. Samas on oluline tähtsus piirkonnas asuva tööstuse mõjudel. 1988-1992. aastal Kundas leitud kambrium-vendi veekompleksi puurkaevude pliikontsentratsioonid ei ületanud tolleaegset lubatud piirnormati 30 µg/l, jäädes vahemikku 2–23 µg/l (Pihlak, 1994). Kui aga arvestada, et tänapäeva normid nii joogi- kui mineraalveele on kolm korda väiksemad – 10 µg/l, siis ei saa hinnata olukorda päris ohutuks.

Oluline on ära märkida, et Eesti elanikkonna teadlikkuse tõusuga on inimesed hakanud rohkem kasutama pudelites müüdavat nn ravi-lauavett ja ka apteekides müügil olevat nn “tervisevett” eeldades, et tegemist on ohutu ja kontrollitud joogiveega. 1992. aastal läbi viidud uuringud näitasid aga müügil olevates pudelivetes erinevate mikrokomponentide (sh plii) kõrgemat kontsentratsiooni. Pliikontsentratsioonid Eesti mineraal-, ravi- ja lauavetes ning karastusjookide ja õlle valmistamiseks kasutatavates kambrium-vendi veekompleksi vetes ületasid mitmel juhul isegi siis kehtinud piirmäära 30 µg/l. (tabel 1) (Lippmaa ja Pihlak, 1992). Samuti analüüsiti imporditavate lauavete mineraalainete sisaldust. Nii ilmnes, et apteekides müüdav lauavesi “Slavjanovskaja” sisaldas 423 µg/l pliid ja mineraalvesi “Essentuki” sisaldas 34 µg/l pliid.

Tabel 1. Plii sisaldused Eesti mineraalvetes (Lippmaa ja Pihlak, 1992)

Mineraalvesi	Pb (µg/l)
“Värsk-2”, naturaalne (pudelist)	20,5
“Värsk” (pudelist)	23
“Pärnu” (pudelist)	67
“Türi-2” lauavesi (pudelist)	124

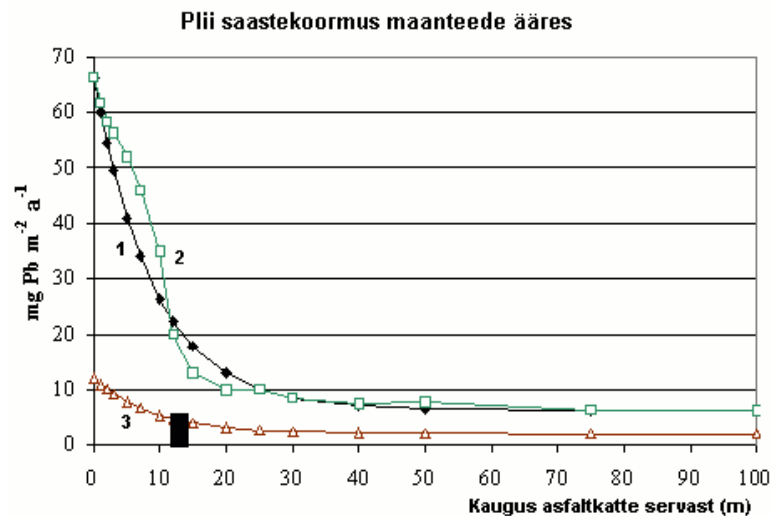
Tuleb märkida, et mikrokomponentide kõrgemad sisaldused Eesti kõige alumise kambrium-vendi veekompleksi mage- ja mineraalvetes ei ole antropogeense saastatuse tagajärg, vaid on nende vete looduslik omadus, mis on tingitud sellest, et vett kandev kiht kontakteerub kristalse aluskihiga, kust mikrokomponendid leostuvad ja satuvad vette. Eestis on pliid sisaldava aluskihiga piirkondadeks märgitud Uljala ja Kunda piirkonnad (Eesti Geoloogiline kaart, 2003).

Eesti õhuseire andmetel oli 2002 aastal Kirde-Eesti linnade keskmine pliisisaldus õhus 0,032 µg/m³. Maksimumkontsentratsioon Tallinna liiklusjaamas küündis 0,112 µg/m³ (Välisõhu seire, 2003).

Eestis on suuremateks õhusaastajateks soojuselektrijaamad ja Kunda Tsemenditehas, mis paiskavad õhku kokku 200000 tonni tolmuheitmeid aastas. Et soojuselektrijaamade poolt õhku paisatud tolmutuhas sisaldub pliid keskmiselt 165,3

g/t, siis võibki arvestada, et nimetatud ettevõtted paiskavad tolmuga õhku 32 700 kg pliid aastas (Kärblane jt, 2000).

Kuna muldade kujundamisest Eestis on valdavalt osa võtnud pliivaesed lähtekivimid ja et senini ei ole meil mullad ka antropogeense tegevuse tagajärjel märgatavalt saastunud, on meie muldade pliiisaldus suhteliselt väike, ületades harva 20 mg/kg (Kiipli ja Orlova, 1996). Siiski tuleb arvestada teeäärsete muldade suurema ja püsivama pliisaastega. Ehkki pliisaaste on tänu pliivabale bensiinile oluliselt kahanenud, säilib intensiivse liiklusega teelõikude ääres siiski teatud risk põllumajanduskultuuride kasvatamisel. Joonis 3 iseloomustab plii saastekoormust intensiivse liiklusega (5000 autot ööpäevas) tee ääres kuni 100 m raadiuses. Joonisel on võrreldud plii koguseid maanteeäärses pinnases enne (kõver 1) ja pärast (kõver 3) pliivaba bensiini kasutusele võtmist. Pliisaastet vähendab teeäärse heki puhverdavat toimet (kõver 2).



Joonis 3. Plii saastekoormus ($\text{Pb mg/m}^2 \text{ a}^{-1}$) maantee ääres, kuni 100 m raadiuses pliietüülitud bensiini kasutamise kõrgperioodil – 1980ndad (kõver 1) ja pärast (kõver 3). Must ristkülik tähistab teeäärset heki ja selle puhverdavat toimet (kõver 2) (Mander ja Oja, 1999).

Pliisisaldus Eesti suurlinnade pinnases on ära toodud alljärgnevas tabelis. Tabelist 2 on näha, et pliiisaldus Tartu ja Tallinna pinnases on oluliselt kõrgem kui hõredama liiklustihedusega maapiirkondades.

Tabel 2. Pliisisaldus Eesti suurlinnade pinnases (Kiipli ja Orlova, 1996)

Võetud proovide piirkond	Pb (mg/kg)
Saastatud mullad	
Tartu Herne tn.	330
Tallinn Basseini tn.	50
Tallinn Trummi tn.	80
Tallinna keskmine	73
Saastamata mullad	
Rapla mk.	28
Tallinna ümbruse keskmine	24

Nagu näha, varieeruvad plii kontsentratsioonid Eesti linnades oluliselt olenevalt saasteallikatest ja liiklustihedusest.

2.2 Plii jagunemine organismis

Kogu plii hulgest, mis täiskasvanud inimese organismi satub, imendub umbes 20% ja sellest omakorda kuni 95% ladestub luukoes. Vastavalt läbiviidud uuringutele võib lastel ja rasedatel naistel imenduda kuni 70% organismi sattunud plii (Hackley ja Katz-Jacobson, 2003; Mayer jt, 2003). Suukaudselt organismi sattunud plii ladestub peamiselt neerudesse, maksa ning luukoesse (WHO, 1992). Luudesse ladestunud plii poolestusaeg ulatub kuni 27,5 aastani. Pehmetes kudedes on poolestusaeg 2-4 nädalat. Uuringud on tõestanud, et plii imendumist organismis suurendab kaltsiumi, raua, tsingi ja teiste eluks vajalike kahevalentsete metallide vaegus organismis (Fat ja Coldea, 1998). Organismi sattunud plii-ioonid konkureerivad aktiivselt teiste kahevalentsete metalliioonidega, põhjustades erinevaid tervisehäireid. Mitmed uuringud on kinnitanud plii-ioonide võimet läbida platsentat ja kahjustada seega veel sündimata loodet (Hackley ja Katz-Jacobson, 2003; Bellinger jt, 1990).

2.3 Pliimürgistuste nähud

2.3.1 Äge mürgistus

Inimestel on surmaga lõppenud juhtumeid kirjeldatud, kui vere pliiisaldus on üle 100 µg/dl (ATSDR, 1999). Ägeda mürgistuse korral on kirjeldatud inimestel peamiselt nn plii-entsefalopaatiat, millega kaasnesid järgmised nähud: krambid, hallutsinatsioonid, silmatõmbused, äkilised haiguspuhangud ning lõpuks surm (Cairney jt, 2002; Cairney jt, 2004). Samuti on näidanud uuringud nii ägeda kui alaägeda pliiimürgituse korral rauavaegusest tingitud aneemia tekkimist (Willows ja Gray-Donald, 2004). Ägeda pliiimürgituse korral täheldatakse silelihasspasmide teket seedetraktis ning sellest tulenevat oksendamist, kõhulahtisust, samuti valude teket kõhupiirkonnas (ATSDR, 1999).

Ägedaid pliiimürgitusi esineb siiski harva. Näiteks Ameerika Ühendriikides on aastatel 1979-1998 registreeritud vaid 200 pliiimürgituse tagajärjel surmaga lõppenud juhtumit. Statistiliselt kõige enam diagnoositi ägedat pliiimürgitust täiskasvanud meestel, kelle vere pliiisaldus ületas 100 µg/dl (Kaufmann jt, 2002).

2.3.2 Krooniline mürgistus

Kroonilisi pliiimürgitusi esineb sagedamini kui ägedaid pliiimürgitusi. Krooniline plii kumuleerumine organismi toimub kokkupuutel igapäevaste väiksemate pliiikogustega. Nii on joogiveest tulenevat plii kroonilist mürgistust kirjeldanud Bonnefoy (1985) ning kõrgeenenud pliiikontsentratsiooni vereplasmas seoses suitsetamisega on kirjeldanud Lahn jt (2003). Rõhutatud on kiirteede ääres elava elanikkonna igapäevast kokkupuudet pliiga õhu kaudu, kus selle tagajärjel oli kodutolmu keskmine pliiisaldus 144,6 g/g (Tong ja Lam, 2000).

Pliikontsentratsiooni veres tõstab ka veini joomine. Erinevate piirkondade veinides võib sisalduda pliid erinevas koguses, ulatudes 24–169 µg/l (Dugo, 2005). Pikaajalise plii toime korral on pliid seostatud oksüdatiivse stressiga (Hande jt, 2004; Hande jt, 2003; Ping-Chi ja Yueliang, 2002). Oulisi seoseid on leitud ka plii ja uimastite toime vahel (Nation jt, 2004).

Üldiselt on määratud kroonilise pliiimürgistuse ilmnemise seoseid vere pliikontsentratsiooniga (Mayer ja Wilson, 1997). Plii krooniline toime organismile sõltuvalt tema kontsentratsioonist veres on järgmine:

60 µg/dl	toime neerudele
50 µg/dl	aneemia
40 µg/dl	kesknärvisüsteem
30 µg/dl	perifeerne närvisüsteem

Üheks oluliseks plii kroonilise kõrgeenenud toime markeriks on osutunud kõrgemad pliikontsentratsioonid luudes, hammastes, juustes ja küüntes (Takagi jt, 1986; Gomes 2004). Plii ladestumisel igemetesse on kirjeldatud stomatiidi ja hallide pliiviirgude teket igemetel (Tvinnereim jt, 2000; Appleton jt, 2000; ATSDR 1999). Kroonilise pliiimürgistuse puhul on leitud ka tsingi ja magneesiumi puudulikkust – madalat sisaldust veres, kus kaasnevaks ilminguks oli aneemia (Fat ja Coldea, 1999).

2.4 Pliimürgistuste avaldumine lastel

Läbiviidud uuringute tulemusena on pliiga kokkupuutumise allikateks lastel märgitud kõige olulisematenä pliid sisaldavaid värve, autokütusest tulenevat pinnasesaastet, aga ka tööstuspiirkondadest tulenevat ja antropogeenset saastet (ATSDR, 1999). Mürgistusi on kirjeldatud eelkõige lastel vanuses 1 kuu kuni 7 aastat. Sellel eluetapil toimub organsüsteemide kasv ja areng eriti kiiresti. Läbiviidud uuringud kinnitavad, et kõrgeimad pliikontsentratsioonid on lastel vanuses 13–24 elukuud, kusjuures reeglina on esinenud kõrgemad pliikontsentratsioonid poistel (Soldin jt, 2003). Lastel kõrget pliikontsentratsiooni veres ja madalat arenguastet on seostatud nende sotsiaalsesse klassi kuuluvusega, samuti elukeskkonna tasemega. Saastunud elukeskkonnast tulenevad sageli ka pliiallikad lastele (Bellinger jt, 1988). Nii on leitud, et pliivärvid, mida küll tänapäeval arenenud riikides ei toodeta, võivad ohuks olla endiselt vaesemate elurajoonide lastele, kus need värvid on endiselt kasutusel. Nii on leitud pliivärve kasutavate perede 10–14 kuu vanustel lastel veres pliid kuni 24,3 µg/dl, kusjuures pliivärve mittekasutava elanikkonna samavanustel lastel oli

pliiikonsentratsioon ligi 2 korda madalam – 12,3 µg/dl (Leighton jt, 2003). Erinevad epidemioloogilised uuringud näitavad kõrgtööstusega piirkondade lastel oluliselt suuremat pliiisaldust veres (kuni 163 µg/dl), võrreldes lastega mittetööstuslikest piirkondadest (Xingquan jt, 1992; Höring jt, 1992). Kirjeldatud on ka joogivee pliiisalduse ja laste veres leitud kõrgeenenud pliiikonsentratsioonide omavahelisi seoseid (Höring jt, 1992; Zietz jt, 2001).

Joogiveest tulenevad probleemid on eriti olulised piirkondades, kus vees sisalduvad pliiikogused ei ole niivõrd antropogeense tegevuse tagajärg, kui võrd kohalikes maakihtides sisalduvatest pliiimineraalidest ja samuti veesüsteemide aegumisest tulenev pliiisaaste (Watt jt, 2000). On teostatud erinevaid uuringuid, kus on analüüsitud lastel esinenud ägedaid pliiimürgistusi ja sellest tulenevaid hilisemaid tagajärgi – aneemiat, närvisüsteemihäireid ja intelligentsi langust. On kirjeldatud ka olukorda, kus ägeda pliiimürgistustega (vere pliiisaldus oli 70–100 µg/dl) lastel tuvastati pärast mürgitust madalam intelligentsi tase, kui see oli mõned aastad varem, kusjuures sellega kaasnesid ka olulised mäluhäired (Fienberg jt, 2002). Sealjuures on leitud, et paljud varases lapseas tekkinud närvisüsteemi kahjustused on pöördumatud (Chiodo jt, 2004; Fewtrell jt, 2004).

2.4.1 Kroonilise mürgistuse mõju laste arengule

Praegu peetakse küll plii ohutuks tasemeks 10 µg/dl, kuid tänapäeval on aktuaalseks muutunud madalatest kontsentratsioonidest tingitud krooniliste pliiimürgistuste kindlakstegemine lastel. Uuringutes on leitud, et plii omaduste tõttu kumuleeruda organismis ja püsida seal, on neuroloogilised kahjustused jälgitavad juba päris madalate vere pliiikonsentratsioonide (<10 µg/dl) juures. Juba 1995. aastal tehti avaldus, mille kohaselt organismile ohutu pliiitaset ei saa kindlalt määratleda (WHO, 1995). Lastel vanuses 6–60 kuud läbi viidud uuringus kasutati intelligentsi määramiseks Stanford-Binet intelligentsusskaalat. 3–5-aastastel lastel tuvastati, et isegi plii sellistel kontsentratsioonidel nagu 3–10 µg/dl veres on tegemist laste intelligentsuse madalama tasemega (Canfield jt, 2003). Sama kinnitas ka teine uuring, mis viidi läbi vanematel – 7,5-aastastel lastel. Selles uuringus leiti otsene seos pliiisalduse ja neuroloogiliste arenguhäirete vahel, sealhulgas tuvastati visuaal-

motoorsed koostõhäreid, madalamad motoorsed oskused ja tähelepanuhäreid. Need olulised arengumuutused leiti juba sellistel madalatel pliikontsentratsioonidel nagu 3 µg/dl (Chiodo jt, 2004).

Uuringud on kinnitanud ka agressiivse ja antisotsiaalse käitumise seoseid kõrgeenenud pliisisaldusega organismis. Uurimistöö, kus määrati noorukeil vanuses 12-16 aastat pliisisaldust luudes kinnitas, et kõrgem pliisisaldus luudes, mis on ladestunud sinna ilmselt kogu lapsea vältel, on tõsine riskitegur täiskasvanueas sotsiaalsete käitumuslike häirete tekkeks (Needelmann jt, 2002). Selle uuringu läbiviimisel võrreldi Pittsburghi linnast pärit noorukite gruppe, kus üks grupp oli valitud kriminaalse käitumise tagajärjel kinnipeetud noorukitest (n=194) ja teine grupp sama linna erinevate keskkoolide õpilastest (n=146). Uuringutulemustest selgus, et kriminaalkorras karistatud noorukite luudes oli $11,0 \pm 32,7$ ppm pliid, sel ajal kui kontrollgrupi pliisisaldus luudes oli $1,5 \pm 32,1$ ppm (Needelmann jt, 2002).

Plii toime on kauakestev ja väikelaste pliimürgituse tagajärjel tekkinud mälu- ja intelligentsusehäired võivad kahjustada nende edasijõudmist nii koolis kui ka edaspidi tööl (Shen jt, 2001).

Seega võib kogu maailmas olla plii kahjuliku toime tagajärjel kahjustatud ilmselt rohkem lapsi, kui praegu arvatakse.

2.5 Plii põhjustatud morfoloogilised muutused ajus ja selle mõju käitumisele

Põhjalikult on kirjeldatud plii mõju erinevatele ioon-spetsiifilistele rakumembraani kanalitele. Üldiselt ei mõjuta plii naatriumi- või kaaliumiioonide kanaleid, kuid mõjutab oluliselt ioonide voolu kaltsiumiioonide kanalis (Bernal jt, 1997). Närvisüsteemis on kaltsiumiioonidel oluline roll närviimpulsi ülekandjate vabastamisel presünaptilistest närvilõpmetest. Nii arvatakse, et plii toime kesknärvisüsteemile tuleneb suures osas sellest, et plii toimib just närviülekannete koliinergilistele presünaptilistele kaltsiumikanalitele (Büsselberg, 1995). Selline plii toime närviülekannetes võib olla analoogne ka inimestel pliist põhjustatud neuropaatia või entsefalopaatia korral.

Loomkatsetes on leitud, et plii toime ulatus on erinev aju eri osades. See viitab hematoentsefaalbarjääri häirumisele. Esimesed plii põhjustatud morfoloogilised muutused toimuvadki mikroveresoonte sisekihi endoteelirakkudes, mis on põhiline struktuurmaterjal hematoentsefaalbarjääris. Mikroveresoonte sisekihis leitud plii kontsentratsioonid on kõrgemad kui teistes ajustruktuurides, mis näitab nende struktuuride soodumust akumuloida pliid. Lühiajaline plii toime põhjustab ka ajuveresoonte düsfunktsiooni. Oletatakse, et aju mikroveresoonte funktsiooni häirumine võib viia ka lokaalse ajuverevoolu muutumisele (Linnamägi, 1998). Eriti olulised struktuursed komponendid hematoentsefaalbarjääris on astrotsüüdid, mis on väga tundlikud plii suhtes juba väikestel kontsentratsioonidel. Plii kutsus esile reaktiivse gliosis, mis on seotud rakusiseste morfoloogiliste muutustega ning selle tagajärjel suureneb erinevate valkude süntees, sealhulgas gliaalse fibrillaarse happelise valgu sisaldus astrotsüütides (GFAP, *glial fibrillary acidic protein*) (Zawia jt, 1996; Stark jt, 1992). Seega eeldatakse, et plii toime hematoentsefaalbarjääri häirumisele ongi seotud eelkõige astrotsüütide kahjustumisega.

Loomkatsete tulemusel leiti, et plii-ioonid pidurdavad valkude moodustumist väikeajus, mis on seotud närvikoe kasvu ja ülekandesünapsi kujunemise regulatsiooniga. Subakuutse või kroonilise manustamise korral võib plii põhjustatud kognitiivseid häireid seostada sünaptilise plastilisuse kahjustamisega, kus plii mõjutab otseselt N-metüül-D-aspartaadi (NMDA) retseptorit. Erinevad *in vitro* ja *in vivo* neurokeemilised uuringud on näidanud, et plii-ioonidel on märkimisväärne inhibeeriv efekt NMDA- retseptori-ioonkanali kompleksile, mis on haaratud ka muutuste tekkesse sünaptilises plastilisuses.

Nagu näha, võib plii mõju ulatus kesknärvisüsteemile olla väga erinev. Arvatakse, et see metall võib esile kutsuda erinevaid neuroloogilisi ja psüühilisi häireid (Haraguchi jt, 2001). Plii toime uuringud *in vivo* kirjeldavad paljusid erinevaid muutusi aju morfoloogias, samuti aju arengus ja õppimisvõimes. Need muutused võivad olla üksteisega seotud või siis tingitud plii valikulisest morfoloogilisest toimest kesknärvisüsteemile (Fullmer, 1997; Calderón-Salinas jt, 1999). Seoses pliiga on kirjeldatud ka laste hüperaktiivsust (Chiodo jt, 2004).

Üks olulisimaid aju limbilise süsteemi struktuure on hipokampus ja mandeltoom, mida otseselt seostatakse mälu ja õppimisvõimega. Morfoloogilisi muutusi aju

hipokampuses on kirjeldatud erinevate pliikontsentratsioonide korral. Nii näiteks leiti madalate pliikontsentratsioonide (20 µg/dl) korral olulist rakkude suuruse ja arvilise tiheduse muutust ning aberrantsete nn. *Mossy* kiudude kihi paksenemist (Campbell jt, 1982; Basha jt, 2002). Hipokampuses toimuvates protsessides, mida otseselt seostatakse mälu ja õppevõimega, on üheks olulisimaks määravaks teguriks närvirakkude neurogenees (Kempermann, 2002).

2.5.1 Neurogenees ja selle roll ajus

Neurogenees on protsess, mille käigus tekivad uued neuronid ehk närvirakud. Pikka aega peeti närvirakke taastumatuteks. Tänapäeval välja töötatud meetodikad aga võimaldavad märgistada prolifereruivaid rakke ning jälgida nende diferentseerumist närvi- või gliiarakkudeks. Sel meetodil on näidatud uute neuronite teket nii täiskasvanud imetajatel kui ka inimesel (Eriksson jt, 1998). Neuraalseid tüvirakke, millest uued neuronid tekivad, on leitud peamiselt kahes eesaju piirkonnas: subventikulaarses tsoonis ning hipokampuses *gyrus dentatus*'e piirkonnas. Subventikulaarses piirkonnas tekkivate neuronite eellasrakud migreeruvad *tuberculum olfactorium*'I, kus toimub edasine diferentseerumine neuroniteks. *Gyrus dentatus*'es aga genereeritakse uusi rakke hiiluse ja granulaarrakkude kihi vahelises tsoonis, mida nimetatakse subgranulaarseks tsooniks. Eellasrakud migreeruvad seejärel granulaarrakkude kihti, diferentseeruvad granulaarneuroniteks ning integreeruvad seejärel vastava piirkonna närviringidesse (Nottebohm, 2002).

Imetajate neurogeneesi on uuritud enamasti kasutades selleks eri liiki närilisi. Närilistel tekib päevas *gyrus dentatus*'es 1000-3000 uut rakku. Võrreldes neuronite koguhulgaga granulaarrakkude kihis (200000-300000), võib uute genereeritavate neuronite arv näida väike, kuid kogu eluea kohta võib see moodustada ligi 20% neuronite koguarvust.

Neurogenees aju hipokampuse piirkonnas on seotud aju oluliste funktsioonidega, kaasa arvatud mälu, õppimine, emotsioonid (Kempermann, 2002). Neurogeneesi reguleerivad mitmed faktorid. Uuringud näitavad, et neurogeneesile mõjuvad soodustavalt nt õppimine ja füüsiline aktiivsus. Neurogenees väheneb vananedes,

siinjuures on oluline osa glükokortikoidide produktsiooni kasvul, kuna glükokortikoididel on eellasrakkude (tüvirakkude) proliferatsioonile pärssiv toime (Gould ja Gross, 2002).

Neurogenees sõltub ka soost ja östrogeenide kontsentratsioonist (Morgan ja Pfaff, 2001). Nii on hipokampuse neurogenees kõrgem emastel rottidel. Ajukahjustuse järgselt (insult, trauma, krambid) on täheldatud neurogeneesi suurenemist. Arvatakse, et selliselt on neurogenees käsitletav kompensatoorne adaptiivse reaktsioonina, mis võib osaleda mälu taastumises. Sarnaselt võib neurogenees aktiveeruda ka neurotoksiinide toimel. Nii näiteks kroonilise etanooli manustamise ajal ja vahetult pärast seda neurogenees vähenes, kuid suurenes oluliselt ärajätuperioodil. Lisaks mõjutas etanool ka uute rakkude fenotüüpi (Zharkovsky jt, 2003).

3 UURIMISTÖÖ EESMÄRGID

Käesoleva magistr töö eesmärgiks oli välja selgitada, kas plii toime varases postnataalses perioodis mõjutab rottidel kognitiivseid funktsioone ja hipokampaalset neurogeneesi täiskasvanueas.

Sellest tulenevalt oli eesmärgiks:

1. uurida plii jaotumist tema kroonilisel manustamisel katseloomade organites ja veres;
2. uurida, kas väikeste pliiannuste manustamine varasemas arenguperioodis põhjustab kognitiivseid ja emotsionaalseid häired täiskasvanud katseloomadel;
3. uurida, kas varajane väikeste pliiannuste manustamine põhjustab hipokampaalse neurogeneesi muutusi täiskasvanud katseloomadel;
4. püstitada hüpotees, kas ka inimesel võivad ajus toimuda plii madalatel kontsentratsioonidel hipokampaalse neurogeneesi muutused, mis mõjutavad inimeste käitumist.

4 MATERJAL JA MEETODID

4.1 Katseloomad ja plii manustamise skeem

Kõik katsed viidi läbi Wistar liiki rottidel (Kuopio Loomuuringute Keskus, Kuopio Animal Research Center, Soome). Täiskasvanud emasloomi (70-80 päeva vanad) hoiti eraldi plastikpuurides 22 °C juures konstantsel temperatuuril, valgustsükliga 12 tundi pimedas ja 12 tundi valguses ning paaritati samast liinist pärit isasloomadega. Pärast poegimist jagati pesakonnad nii, et igasse pesakonda jäi 8 poega. Pesakonnad jagati kahte gruppi: pliiigrupi loomadeks ja kontrollgrupi loomadeks.

Pliiigrupi loomi joodeti 30 päeva jooksul 0,2% pliiatsetaadi ((CH₃COO)₂Pb) lahusega. Kontrollgrupi loomi joodeti samal ajal destilleeritud veega. Katses kasutati pliid sisaldava lahuse valmistamiseks analüütilise puhtusega pliiatsetaati firmalt Reaxim (Venemaa). Pliiatsetaadist valmistati 0,2% pliiatsetaadi lahus. Lahust uuendati igal nädalal, kuni pliiilahuse manustamise skeemi lõpuni.

Tahke toit vastas vivaariumi nõuetele ja seda said mõlemad rühmad ühtemoodi. Kogu katse vältel oli nii söök kui ka jook loomadele vabalt kättesaadav (*ad libitum*).

Pojad võõrutati 21 päeva vanuselt ja jagati viie isaslooma kaupa puuridesse. Pliiatsetaadi lahuse manustamine jätkus poegade 30-päevaseks saamiseni. Sünnijärgsest 30. päevast alates kuni täiskasvanueani (60. päev), joodeti mõlemale rühmale destilleeritud vett. Kogu katseaja vältel nii kontrollgrupi- kui pliiigrupi loomad kaaluti ning mõõdeti nende poolt joodava vedeliku hulk ja söödud toidu kogus. Poegade kaal, emasloomade ja poegade vedeliku- ning toidutarbimine mõõdeti kaalumismeetodil.

4.2 Pliikontsentratsiooni määramine

4.2.1 Pliikontsentratsiooni määramine veres ja kudedes

Pliikontsentratsiooni määramiseks veres ja ajukudedes kasutati ETAAS PU9100X aatomabsorptsioonspektromeetrit, mis oli varustatud Philips HGA/P3105 grafiitahju ja deuterium taustakorrektooriga. Pliid määrati lainepikkusel 283,3 nm. Analüüs telliti Tallinna Tehnikaülikooli keemialaborist, mis omab akrediteeringut Eesti Akrediteerimiskeskuse poolt raskmetallide määramiseks bioloogilistes materjalides.

4.2.2 Pliikontsentratsiooni määramise skeem

Pliikontsentratsioon määrati pliigrupi loomadel ja kontrollgrupi loomadel veres ja ajukoos 15., 30., 60. ja 80. elupäeval. Pliikontsentratsioon määrati 30. ja 60. elupäeval ka järgmistes organites: neerud, maks ja luukude.

4.2.3 Vere ja kudede töötlemine enne pliikontsentratsiooni määramist

Selleks uuringuks eraldatud loomagruppide (3-4 looma grupis) poegadelt võeti pliikontsentratsiooni määramiseks verd ja kudesid 15., 30., 60. ja 80. päeval pärast sündi. Samuti võeti loomadelt pliikontsentratsiooni määramiseks järgmised organid: maks, neerud ja tagumine parem sääreluu. Loomad anesteseeriti kloraalhüdraadi lahusega (350 mg/kg) ning veri plii analüüsiks võeti südamest. Seejärel perfuseeriti loomi kohe füsioloogilise lahusega (0,9% NaCl lahus) ning 4% paraformaldehüüdiga naatriumfosfaat-puhverlahuses. Veri, ajukoed ning organid külmutati koheselt -70 °C juures.

4.3 Käitumiskatsed

Käitumiserinevuste väljaselgitamiseks kontroll-loomadel ja pliid saanud loomadel viidi läbi järgmised käitumiskatsed: lokomotoorse aktiivsuse katse, pluss-puuri katse ja kontekstuaalse mälu katse.

Katsed teostati loomadega nende 60.-80. elupäeval.

4.3.1 Lokomotoorse aktiivsuse katse

Lokomotoorse aktiivsuse katse viidi läbi selleks, et hinnata loomade liikumisaktiivsuse muutusi. Katse viidi läbi loomadel 60. elupäeval. Selleks kasutati kaameraga varustatud katsesüsteemi, mis registreeris loomade liikumise katseseadmes, milleks oli puidust kast suurusega 50 x 50 x 55 cm. Arvutiga ühendatud valgustundlik videokaamera asetses katseseadme põhjast 1 m kõrgusel. Liikumisaktiivsuse registreerimiseks ning tulemuste analüüsimises kasutati VideoMot2 tarkvara (TSE Systems, Saksamaa). Uuring toimus kindlal ajavahemikul 9.00-12.00. Loomad asetati kasti keskele ja 30 minuti jooksul registreeriti nende liikumistee pikkus (cm), puhkeaeg (s), liikumiskiirus (cm/s) ja liikumisaktiivsus (s).

4.3.2 Pluss-puuri katse

Pluss-puuri katse abil hinnati ärevusest või hirmust tingitud liikumisaktiivsuse muutusi. Antud katse viidi läbi eelnevalt kirjeldatud viisil (Trombini jt, 2001). Katses kasutati kahe suletud ja kahe avatud haaraga alust. Ristiasetsevate haarade mõõdud olid 50 x 10 (p x l) cm. Suletud haar oli varustatud seintega, mille kõrgus oli 40 cm. Katse läbiviimisel asetses alus põrandast 50 cm kõrgusel. Katse viidi läbi Tartu Ülikooli Biomeedikumi vivaariumi ruumides. Uuring toimus kindlal ajavahemikul 9.00–10.00. Katse läbiviimiseks asetati loom katseseadme keskele näoga avatud haara suunas ning mõõdeti looma viibimine avatud haaral ja suletud haaral. Samuti loendati 5 minuti jooksul looma liikumise arv kordades suletud haaralt avatud haarale ja vastupidi. Katse lõpetamise järel võeti rott katseseadmest välja ja pandi kodupuuri tagasi. Pluss-puur puhastati 5%-lise etüülalkoholilahusega. Seejärel teostati katse järgmise rotiga.

Tulemustes esitati suletud ja avatud haaradel viibimise aeg protsentides ning avatud haarale sisenemine protsentides.

4.3.3 Kontekstuaalse mälu katse

Mälutestina kasutati kohast sõltuvat hirmureaktsioonikatset, mis peegeldab eelkõige hipokampaalse mälu funktsiooni formeerumist. Kontekstuaalse mälu katse viidi läbi nii kontrollloomadega kui pliidi saanud loomadega 80. elupäeval. Uuring toimus kindlal ajavahemikul 9.30–14.00. Katses kasutati katseseadet mõõtmetega 220 x 160 x 160 mm (P x L x K). Katseseadme kolm seinu olid valmistatud läbipaistmatust plastikust, neljas sein oli läbipaistev. Põranda moodustasid elektrit juhtivad raudvarvad. Katseseade oli ühendatud elektrilööki reguleeriva arvuti ja tarkvaraga.

Selleks, et määrata loomade hirmureaktsiooni peegeldavat tardumise baasaktiivsust lasti igal loomal 5 minutit katseseadmes viibida ja selle aja jooksul mõõdeti tardumisseisundite summaarne aeg. Neid mõõtmisi viisid läbi kaks katse suhtes sõltumatut jälgijat. Pärast baasaktiivsuse mõõtmist anti igale katseloomale 1-minutiliste intervallidega kolm elektrilööki voolutugevusega 0,8 mA/1s. Seejärel asetati loomad tagasi kodupuuridesse. 24 tunni pärast pandi loomad samasse katseseadmesse, kuid elektrilööki ei antud ning mõõdeti looma summaarne tardumisaeg viie minuti jooksul. Sama katset korrati ka 48 ja 72 tunni pärast. Andmed esitati summaarse tardumisseisundi kohta 5 minuti jooksul.

4.4 Neurogeneesi katse

Eesmärgiga uurida neurogeneesi nii kontroll-loomadel kui ka pliid saanud loomadel, süstiti neile 80. elupäeval kolmel korral 2-tunnise intervalliga 5-bromo-2'-deoksüüridiini (BrdU) (Boehringer Mannheim) 100 mg/kg (0,4 ml/100 g kehakaalu kohta). BrdU on tümidiini analoog, mis inkorporeeritakse uute tekkinud rakkude DNA ahelasse S-faasi vältel, ning märgistab jagunevad eellasrakud. Hilisem immunohistokeemiline analüüs võimaldab nii määrata kvantitatiivset ja kvalitatiivset neurogeneesi.

Kakskümmend neli tundi pärast viimast BrdU manustamist perfuseeriti pooled kontrollgrupi (n = 6) ja pliid saanud grupi (n = 6) loomad ja nende ajud võeti immunohistokeemilisteks analüüsideks, et määrata uute tekkinud rakkude hulk.

Selleks, et määrata uute tekkinud rakkude elulemus ja diferentseerumine, manustati ülejäänud loomadele (kontroll-loomad n = 6, pliid saanud loomad n = 6) BrdU-d ning loomad perfuseeriti kolme nädala möödudes. Immunohistokeemiliseks BrdU-positiivsete rakkude märgistamiseks anesteseeriti loomad kloraalhüdraadiga (400 mg/kg) ja seejärel perfuseeriti koheselt füsioloogilise lahuse (0,9% NaCl lahus) ning 4% paraformaldehüüdiga fosfaatpuhverdatud soolalahuses (*Paraformaldehyde Sodiumphosphate Buffer Solution*) (PBS 0,1 M, pH 7,4). Ajud eemaldati ja fikseeriti 24 tundi fiksaatori lahuses. Koronaarlõigud (40 µm) lõigati vibratoomil (Leika VT1000, Saksamaa) hipokampuse piirkonna ulatuses. Ajulõigud asetati 24 süvendiga PBS lahusega täidetud koekultuuriplaatidele, kronoloogilises järjekorras ja säilitati 4 °C juures.

4.4.1 Immunohistokeemia

4.4.1.1 Proliferatsioon

BrdU-positiivsete rakkude immunohistokeemiliseks määramiseks inkubeeriti ajulõike PBS lahuses 0,3% H₂O₂ manulusel 30 minutit, seejärel inkubeeriti ajulõike 10 minutit puhver- datud trüpsiinilahuses (0,1 M Tris-HCl (pH 7,4), mis sisaldas 0,025% trüpsiini ja 0,1% CaCl₂). Sellele järgnes ajulõikude inkubeerimine 30 minutit 2 N HCl lahuses termostaadis 37 °C juures. Pärast seda hoiti ajulõike 0,1 M boorhappe PBS lahuses 5 minutit ning seejärel üks tund blokeerivas lahuses (2% jänese normaalseerumit sisaldavas puhverdatud füsioloogilises lahuses, mis sisaldas veel 0,25% Triton X-100). Sellele järgnes 24-tunnine inkubatsioon 4 °C juures roti BrdU-vastase monoklonaalse antikehaga (1 : 200) (Accurate Chemical Scientific Corp., USA). Pärast pesemist PBS lahusega inkubeeriti ajulõike 1 tunni jooksul jänese rotivastase biotinüleeritud antikehaga (1 : 400) (Vector Laboratories, Inglismaa), mis oli lahustatud blokeerivas puhvis. BrdU-positiivsed rakud visualiseeriti, kasutades peroksüdaasimeetodit. Lõike inkubeeriti avidiini-biotiini lahuses (ABC-kit, Vector laboratories) 1 tund toatemperatuuril ja BrdU-positiivsete rakkude visualiseerimiseks kasutati 3,3'-diaminobensidiini (DAB) (Vector Laboratories). Pärast värvimist pesti ajulõike kraaniveega, asetati need klaasile ning kuivatati 15-20 minutit. Seejärel pandi lõikudele peale 99% p-ksüleeni ning palsamit (Assistant, Saksamaa) ja kaeti katteklasisiga.

4.4.1.2 Diferentseerumise määramine

Nende BrdU-positiivsete rakkude märgistamiseks, mis on omandanud fenotüübi, kasutatakse immunohistokeemilist kaksikmärgistamist. Kolokalisatsiooni uuringuks võeti kolm nädalat pärast BrdU süstimist perfuseeritud loomade ajulõigud nii kontrollgrupi kui ka pliigrupi loomadelt.

Ajulõike inkubeeriti roti BrdU-vastase monoklonaalse antikehaga (1 : 400) (Accurate Chemical Scientific Corp., USA), ning hiire Tuj1-vastase (neuronaalse klassi III β-tubuliin, noorte neuronite marker) monoklonaalse antikehaga (1 : 500) (Bab-Co, USA), küüliku kalbindiinivastase (täiskasvanud neuronite marker) polükloonaalse antikehaga (1 : 800) (Chemicon International, Inglismaa) või küüliku GFAP-vastase

(*glial fibrillary acidic protein*, astrotsüütide marker) monoklonaalse antikehaga (1 : 1000, Chemicon International, Inglismaa). Teised kasutatavad antikehad olid vastavalt: kitse roti-vastane konjugeeritud antikeha koos Alexa-594-ga (1 : 800, Molecular Probes, Holland) ning lisaks kas kitse hiirevastane Alexa-488 konjugaat (1 : 800, Molecular Probes, Holland), või kitse jänesevastane Alexa-488 konjugaat (1 : 1000); (Molecular Probes, Holland), millega inkubeeriti 1 tund. Peale seda lõigud pesti ning asetati alusklaasile, kaeti fluorestsentsi kaitsva kattededelikuga ning katteklaasiga.

4.4.1.3 Rakusurma määramine

Neuronaalne surma detekteerimiseks kasutati Fluoro-Jade-ga märgistamist. Selleks kasteti ajulõigud 3 minutiks 100% etanooli sisse ja rehüdratiseeriti. Seejärel inkubeeriti ajulõike 0,06% kaaliumpermanganaadi lahuses 15 minutit, loputati destilleeritud veega ja inkubeeriti lahuses, kus oli 0,001% Fluoro-jade (Histo-Chem, Jefferson, USA) 0,1 %-lises äädikhappe lahuses, 30 minutit. Ajulõigud loputati veega, asetati klaasile ning kuivatati 15-20 minutit. Seejärel pandi lõikudele 99% p-ksüleeni ning palsamit (Assistant, Saksamaa) ja kaeti katteklaasiga.

4.4.2 Rakkude lugemine

BrdU-positiivsete rakkude ja kogurakkude hulga määramise aluseks oli stereoloogiline printsiip, ning kasutati optilise disektori meetodit (West 1993). Looma BrdU-positiivsete kogurakkude arv saadi iga kuuenda hipokampuse piirkonna lõigu rakkude lugemisel, kusjuures esimene lõik valiti esimese kuue lõigu seast juhuslikult ning seejärel võeti edasi süsteemselt iga kuues lõik. Pildid saadi kasutades 60 kordse suurendusega objektiivi, mis oli kaetud immersioonõliga, mikroskoobiga BX-51 (Olympus, Saksamaa). Stereoloogiasüsteem oli varustatud kolmemõõtmeliselt (x-, y-, ja z- telge mööda) liikuva motoriseeritud aluse (Prior Scientific, Inglismaa), lineaarse liikumise digitaalsensoriga ND 281B (Heidenhain, Saksamaa) ja DXC-950P 3-CCD Sony videokaameraga. Igal loomal loeti BrdU-positiivsed rakud *gyrus dentatus*´est kasutades selleks kaheksat-üheksat ajulõiku vastavalt looma hipokampuse suurusele. Hipokampuse kogurakkude arv saadi kaheksast lõigust loetud rakkude summa 10-ga korrumisel. Parem ja vasak *gyrus dentatus* analüüsiti eraldi ning tulemused saadi iga looma kohta.

4.4.2.1 *Gyrus dentatus*'e ruumalade arvutamine

Gyrus dentatus'e ruumalade mõõtmisel kasutati CAST stereoloogilist tarkvara (Olympus, Taani).

Struktuuri ruumala määramine toimus vastavalt Cavalieri printsiibile (ruumala arvutamine punktide süsteemi kasutades). Määrati ära lugemisraami punktide paiknevuse tihedus ehk A_p , mis on pindalaline suurus. Loeti kõik punktid, mis kattusid meie struktuuriga ja kuna A_p väärtus (μm^2) on teada, lõigu paksus on 40 μm ja distants (iga 10-s) on teada, siis saame arvutada V:

$$V = \frac{\Sigma \cdot Q}{A_p \cdot 40 \cdot 10}$$

V – ruumala

A_p – punktide paiknevuse tihedus

$\Sigma \cdot Q$ – loetud punktide summa

4.4.3 BrdU-positiivsete rakkude fenotüübi määramine

Fluorestsentssignaalide tuvastamiseks kasutati konfokaalmikroskoopi MRC-1024 (Olympus/Bio-Rad, Saksamaa), mis oli varustatud argoon-krüptonlaseriga. BrdU-positiivseid rakke analüüsiti BrdU ja Tuj1 (noorte neuronite marker), BrdU ja kalbindiin (küpsete neuronite marker) ning BrdU ja GFAP (astroglia marker) kolokalisatsiooni suhtes. Igal loomal ($n = 6$) analüüsiti kokku 50-100 BrdU-positiivset rakku ja tulemustes esitati fenotüüpi väljendavate BrdU-positiivsete rakkude keskvaartuse protsendina ja keskmise standardveana.

4.5 Andmeanalüüs

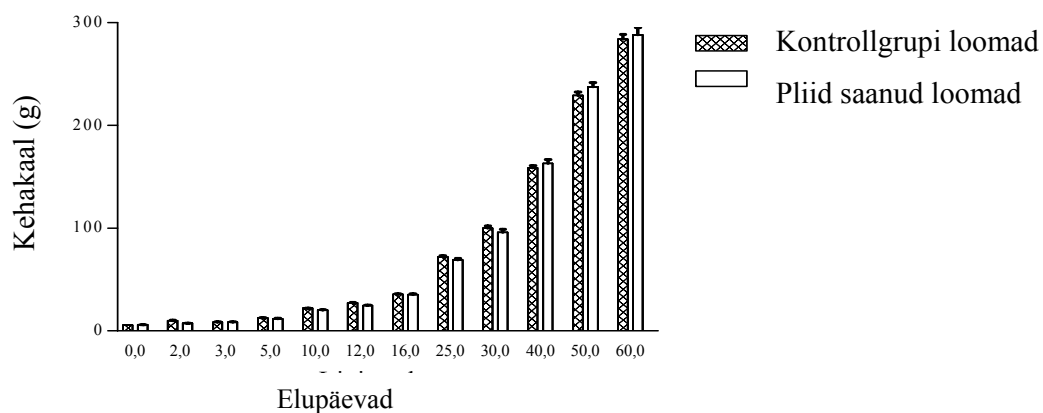
Andmeanalüüsi läbiviimiseks kasutati arvutitarkvaraprogrammi GraphPadPrism 3.00. Andmed esitati keskmise standardveaga (\pm SEM) ning statistilised võrdlused viidi läbi, kasutades kas dispersioonanalüüsi (one-way ANOVA), millele järgnes Bonferroni test, või Student t-testi.

5 TULEMUSED

5.1 Loomade kehakaal ja üldine toitumus

Kogu katseaja vältel kaaluti nii kontroll-, kui ka pliigrupi loomi ja mõõdeti nii nende poolt joodud vedeliku kui söödud toidu kogus.

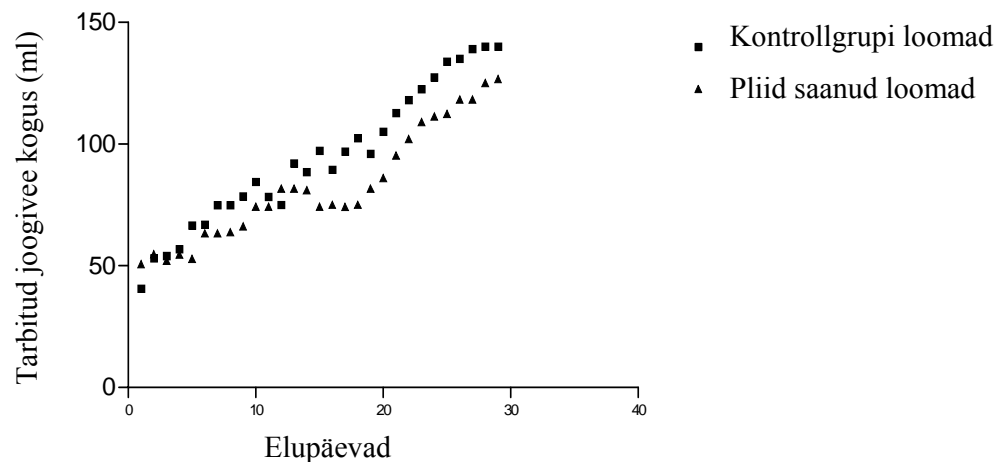
Kaalumistulemuste põhjal võib öelda, et pliit manustamine ei põhjustanud pliit saanud loomade kaalus olulisi erinevusi võrreldes kontroll-loomadega (joonis 4) Kõikide katseloomade kaal suurenes elupäevade jooksul proportsionaalselt.



Joonis 4. Kehakaalu muutused elupäevade jooksul kontroll-loomadel ja pliit saanud loomadel. Andmed on esitatud koos keskmise standardveaga (\pm SEM).

Kuna pliitsetaadi lisamine veele võis muuta loomadele antava vee maitseomadusi, on oluline katse läbiviimisel ka mõlema katserühma loomade poolt joodud vee hulga võrdlemine.

Mõõtmised näitasid, et olulist vahet joodava vee hulgas ei ilmnenu (joonis 5).



Joonis 5. Joogivee tarbimine kontroll-loomadel ja pliidi saanud loomadel. $P=0,0938$ (Student t-test).

5.2 Pliikontsentratsioonid veres ja ajukoos

Pliikontsentratsioon määrati pliidi saanud loomade ja kontroll-loomade veres ja ajudes 15., 30., 60. ja 80. elupäeval. Vastavalt saadud tulemustele tõusis 15. elupäevaks pliidi saanud loomade vere pliisisaldus keskmiselt kuni $29,3 \mu\text{g/dl}$. Seejärel 30. elupäevaks, kui poegadel oli otsene ligipääs joogiveele, tõusis vere pliisisaldus kuni $34,26 \mu\text{g/dl}$. Katseloomade 30. elupäeval eemaldati plii pliigrupi loomade joogiveest ning mõlema grupi loomadele manustati kuni täiskasvanuks saamiseni (60. elupäevani) destilleeritud vett. Sel perioodil, kui loomad said pliivaba destilleeritud vett, langes vere pliisisaldus pliidi saanud loomadel $10,4 \mu\text{g/dl}$. Kontrollrühma loomadel oli vere pliisisaldus samal ajal konstantne, jäädes tasemele $4,2 \mu\text{g/dl}$ (tabel 3).

Tabel 3. Pliikontsentratsioonid kontroll-loomade ja pliidi saanud loomade veres ja ajukudedes elupäevade lõikes 0,2% pliiatsetaadi lahuse manustamise ajal (15. ja 30. elupäeval) ning pärast (60. ja 80. elupäeval). Andmed on esitatud koos keskmise standardveaga (\pm SEM) 3-6 looma analüüsitulemuse kohta vastaval ajahetkel (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

	Elupäevad				
	15	30	60	80	Kontroll
Veri ($\mu\text{g/dl}$)	$29,3 \pm 5,0^{**}$	$34,2 \pm 5,8^{**}$	$10,4 \pm 3,2$	$6,5 \pm 1,2$	$4,2 \pm 1,7$
Aju (ng/g)	$456 \pm 23^{**}$	$781 \pm 87^{**}$	$20 \pm 8^*$	6 ± 1	6 ± 2

5.3 Plii sisaldus kontroll-loomade ja pliid saanud loomade teistes organites

Vastavalt saadud tulemustele tõusis 30. elupäevaks pliid saanud loomade pliisisaldus maksas kuni 3673 ng/g, neerudes kuni 6890 ng/g ja luukoes kuni 104,5 µg/g.

Pärast plii eemaldamist 30. elupäeval, langes 60. elupäevaks pliisisaldus maksas 445 ng/g, neerudes 3590 ng/g ja luukoes 45,4 µg/g-ni.

Kontroll-loomade organite pliisisaldus samal ajal oli konstantne (tabel 4).

Võrreldes kontroll-loomadega jäi pliisisaldus 60. elupäevaks pliid saanud loomade kõikides analüüsitud organites oluliselt kõrgemaks.

Tabel 4. Pliikontsentratsioonid kontroll-loomade ja pliid saanud loomade neerudes, maksas ja luukoes elupäevade lõikes 0,2% pliiatsetaadi lahuse manustamise ajal (30. elupäev) ja pärast (60. elupäev). Andmed on esitatud koos keskmise standardveaga (\pm SEM), 4 looma analüüsitulemusest vastaval ajahetkel (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

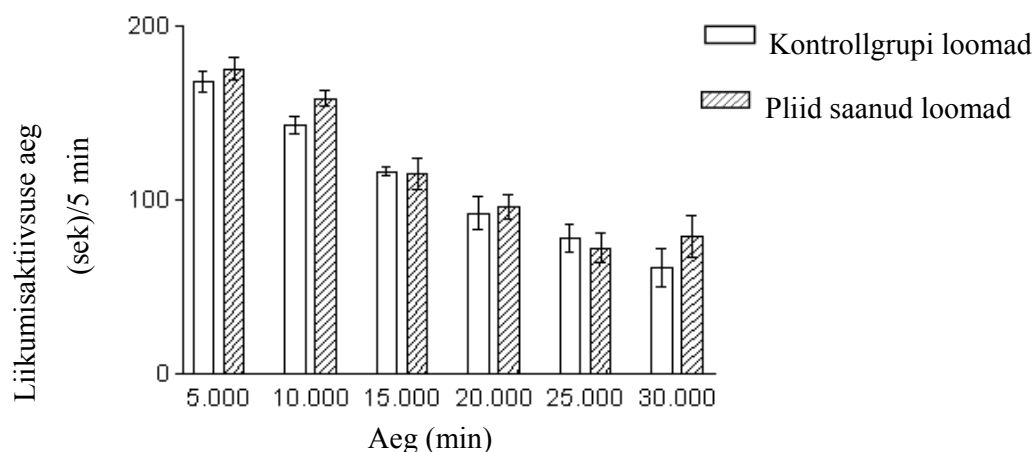
	Elupäevad		
	30	60	Kontroll
Neerud (ng/g)	6890 \pm 1019**	3590 \pm 384,6**	268,1 \pm 56,56
Maks (ng/g)	3673 \pm 703**	445 \pm 140*	86 \pm 25
Luukude (µg/g)	104,5 \pm 20,4**	45,4 \pm 11,7**	0,29 \pm 0,07

5.4 Käitumine

5.4.1 Lokomotoorne aktiivsus

Lokomotoorse aktiivsuse katse läbiviimiseks kasutati arvutiga ühendatud kaameraga katsesüsteemi, mis fikseeris loomade liikumistee pikkuse (cm), puhkeaja (s), liikumiskiiruse (cm/s) ja liikumisaktiivsuse (s).

Antud meetodil läbiviidud uudes keskkonnas liikumisaktiivsuse uuringute tulemused ei näidanud pliidi saanud loomade ja kontrollloomade vahel olulisi erinevusi nende liikumistee pikkuses, puhkeajas ja liikumiskiiruses. Samuti ei esinenud erinevusi kontrollloomade ja pliidi saanud loomade liikumisaktiivsuses (joonis 6).



Joonis 6. Liikumisaktiivsus kontrollloomadel ja pliidi saanud loomadel 30 minutise jälgimisaja jooksul ($n = 8$). Andmed on esitatud koos keskmise standardveaga (\pm SEM).

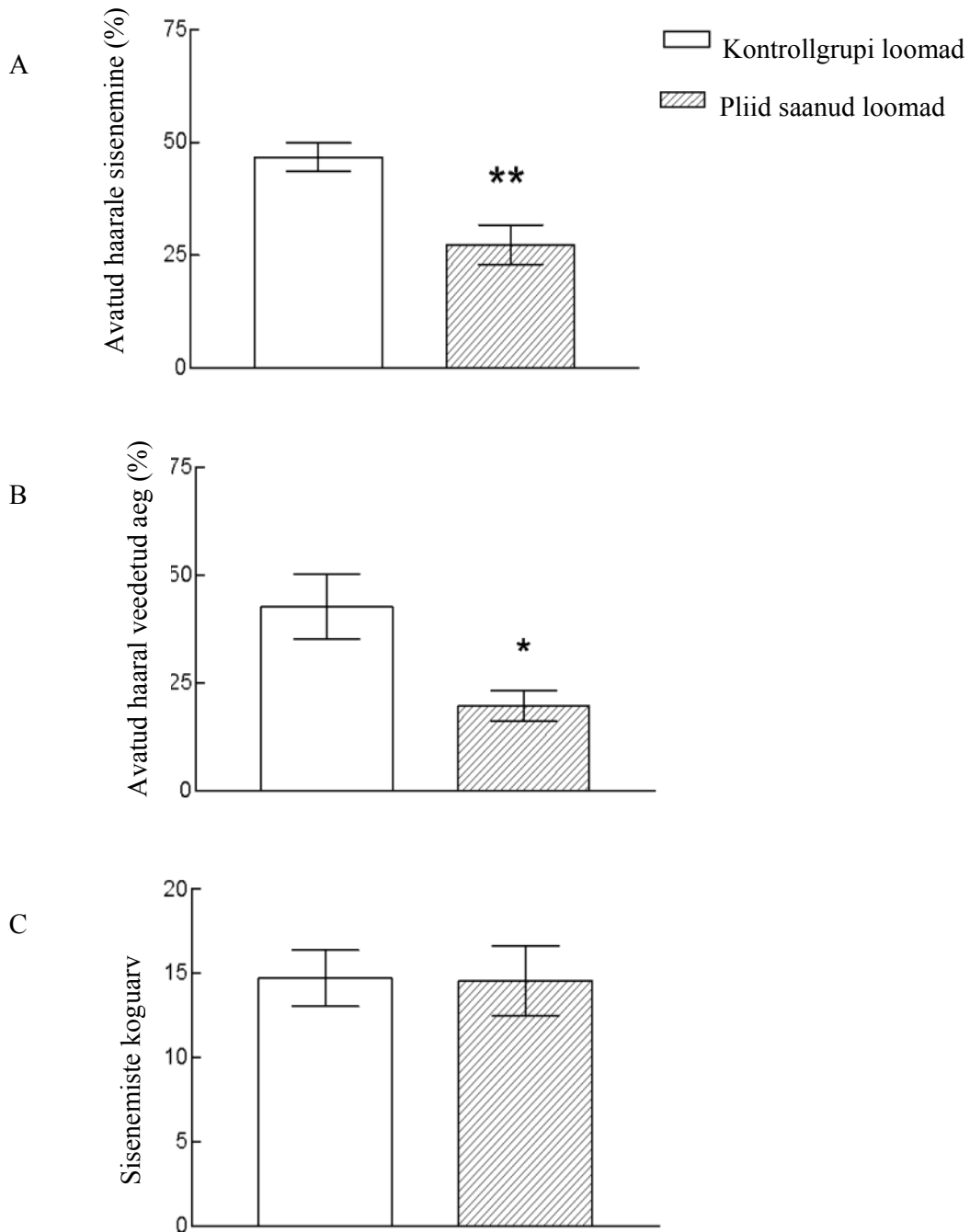
5.4.2 Loomade käitumine pluss-puuris

Katses kasutati kahe suletud ja kahe avatud haaraga alust. Selle katse läbiviimiseks asetati loom aluse keskele näoga avatud haara suunas ning mõõdeti 5 minuti jooksul looma viibimine avatud haaral, suletud haaral ning samuti looma jooksmiste arv suletud haaralt avatud haarale ja vastupidi.

Andmed arvutati protsendina ajast, mis veedeti avatud haaral ja protsendina sisenemistest avatud haarale.

Pliid saanud loomad näitasid selle käitumiskatse jooksul kõrgemat ärevuse taset, nagu tõestasid ümberarvutused sisenemiste protsendi (joonis 7 A) ja avatud haaral veedetud aja protsendi (joonis 7 B) alusel.

Samal ajal ei täheldatud suuremat liikumisaktiivsust pliid saanud loomadel, kuna sisenemiste arv haaradele ei erinenud kontrollgrupi sisenemistest (joonis 7 C).



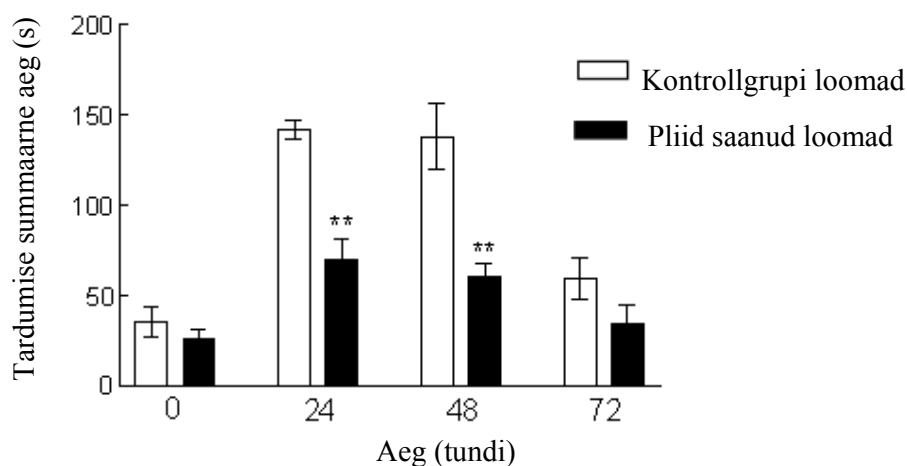
Joonis 7. Väikeste pliianuste varasel postnataalsel arenguperioodil manustamise tagajärjel tekkinud käitumiserinevused. A – avatud haarale sisenemiste protsent kontroll-loomadel ja pliid saanud loomadel; B – avatud haaral veedetud aeg protsentides kontroll-loomadel ja pliid saanud loomadel; C – avatud ja suletud väljadele sisenemiste koguarv kontroll-loomadel ja pliid saanud loomadel. Andmed on esitatud koos keskmise standardveaga (\pm SEM) 8 looma analüüsitulemuse kohta. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Student t-test).

5.4.3 Kontekstuaalne mälu

Katseloomade kontekstuaalse mälu hindamiseks hinnati loomade tardumise fooni. Selleks lasti igal loomal 5 minuti jooksul katseseadmes viibida ja mõõdeti selle aja jooksul tema tardumisseisundite summaarne aeg. Neid mõõtmisi viisid läbi kaks katse suhtes sõltumatut jälgijat. Tardumise baasaktiivsus oli pliidi saanud loomadel $25,7 \pm 6,8$ min ($n = 9$), ning see ei erinenud oluliselt kontroll-loomade grupi baasaktiivsusest – $20,4 \pm 4,6$ min ($n = 9$).

Pärast tardumise baasaktiivsuse mõõtmist, anti igale katseloomale kolm elektrilööki intervalliga 1 minut voolutugevusega 0,8 mA/1s ja pärast seda asetati loomad tagasi kodupuuri.

Loomade mäluseisundi hindamiseks pandi loomad samasse olukorda 24, 48 ja 72 tunni pärast ning fikseeriti tardumiste summaarne aeg 5 minuti jooksul (joonis 8). Hinnates saadud tulemusi võib öelda, et pliidi saanud loomade kontekstuaalne mälu on oluliselt halvem kui kontroll-loomadel.



Joonis 8. Kontekstuaalse mälu erinevus kontroll-loomadel ja pliidi saanud loomadel. Tardumiste summaarne aeg 5 minuti jooksul 24, 48 ja 72 tunni pärast elektrilööki. Andmed on esitatud koos keskmise standardveaga (\pm SEM), ($n = 9$). ** $p < 0,01$ (Bonferroni test)

5.5 Neurogenees

5.5.1 Proliferatsioon

Et uurida eeldatavat efekti neuronaalsete ja/või gliaalsete prekursorite proliferatsioonile kontroll-loomadel ja pliid saanud loomadel täiskasvanueas, manustati 80. päeva vanustele rottidele proliferatsioonimarkerit BrdU (300 mg/kg, koguannus) ja 24 tunni pärast määrati BrdU-positiivsete rakkude hulk nii kontroll-kui pliid saanud loomadel.

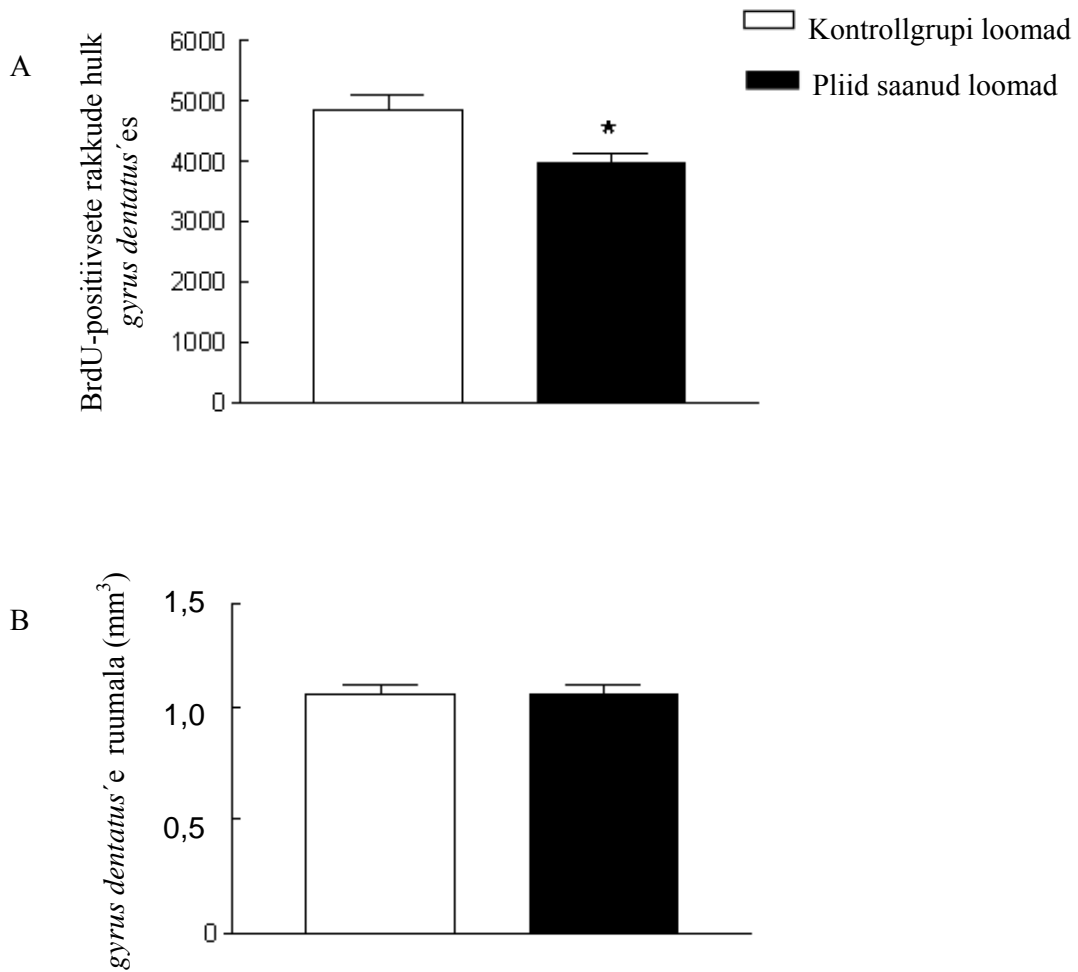
BrdU-positiivsed rakud esinesid mõlemal grupil korrapäratute 2-3 rakust koosnevate kogumitena, mis asetsesid granulaarrakkude kihi ja hiiluse äärel (joonis 4, lk 80 A, B).

BrdU-märgistatud rakkude hulk oli pliid saanud loomadel oluliselt väiksem kui kontroll-loomadel ($p < 0,05$) (joonis 9 A).

Vähenenud proliferatsiooni aktiivsus *gyrus dentatus*'es ei olnud samas seostatav *gyrus dentatus*'e ruumalade erinevustega (joonis 9B).

5.5.2 Rakkude elulemus

Et tuvastada ellujäänud BrdU-positiivsete rakkude hulka pärast Pb manustamist, loendati BrdU-positiivsete rakkude hulk *gyrus dentatus*'es kolm nädalat pärast BrdU manustamist. Uuringute tulemused ei näidanud erinevusi BrdU-positiivsete rakkude elulemuses kontroll-loomadel ja pliid saanud loomadel. Pliid saanud rakkude elulemus oli 39,4% ja ei erinenud oluliselt kontroll-loomade elulemusest – 47,8% (n = 6).



Joonis 9. Varases postnataalses arenguperioodis väikeste pliiannuste manustamise toime närvirakkude proliferatsioonile täiskasvanud rottidel. A – uute rakkude proliferatsioon *gyrus dentatus*'es; B – *gyrus dentatus*'e ruumala kontroll-loomadel ja pliidi saanud loomadel. Andmed on esitatud koos keskmise standardveaga (\pm SEM), (n = 6). *p < 0,05 (Student t-test).

5.5.3 Rakkude diferentseerumine

Uute, *gyrus dentatus*'s tekkinud BrdU-märgistatud rakkude fenotüübi määramiseks, teostati BrdU ja neuronaalsete või gliaalsete fenotüüpide (astroglia) märgistamine 3 nädalat pärast BrdU manustamist.

Tulemused näitasid, et kontroll-loomadel oli ellujäänud BrdU-positiivseid rakke, mis olid märgistatud täiskasvanud neuronite markeri kalbindiin' iga, oli $40,6 \pm 3,4\%$. Samas oli pliid saanud loomadel täiskasvanud kalbindiin-positiivseid neuroneid ainult $28,7 \pm 3,5\%$ ($p < 0,05$).

Noorte postmitootiliste neuronite markeri Tuj1-ga märgistatud rakke oli, vastupidi, oluliselt rohkem pliid saanud loomadel kui kontroll-loomadel ($p < 0,01$). Lisaks diferentseerus pliid saanud loomadel oluliselt suurem hulk BrdU-positiivseid rakke astroglia rakkudeks kui kontrollloomadel.

Tabel 5. Varases postnataalses arenguperioodis väikeste pliiannuste manustamise toime täiskasvanud rottidel uute rakkude diferentseerumisele *gyrus dentatus*'es. Rottidele manustati eellasrakkude markerit BrdU (300 mg/kg) ja kolm nädalat hiljem uuriti BrdU-positiivsete rakkude kolokalisatsiooni neuronaalsete või gliaalsete markeritega. BrdU-positiivsete rakkude arv uuritava looma kohta oli 50-100.

Andmed on esitatud koos keskmise standardveaga (\pm SEM) ($n = 6$).

(* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) (Student t-test).

Grupp	BrdU-positiivsete rakkude hulk 3 nädalat pärast BrdU manustamist	kolokalisatsioon Tuj1-ga (%)	kolokalisatsioon kalbindiiniga (%)	kolokalisatsioon GFAP-ga (%)
Kontroll	2320 ± 133	$11,3 \pm 2,6$	$40,6 \pm 3,4$	$11,9 \pm 3,4$
Pb saanud	$1562 \pm 256^*$	$30,1 \pm 3,4^{**}$	$28,7 \pm 3,5^*$	$35,4 \pm 5,1^*$

6 ARUTELU

Möödunud sajandi jooksul suurenes plii sattumine keskkonda eelkõige seoses pliid sisaldavate autokütuste laialdase kasutamisega. Selle tagajärjel kumuleerumis plii kõikjale ümbritsevasse keskkonda ja sealt omakorda inimese organismi. Viimaste aastakümnete jooksul on püütud keskkonda sattuva plii koguseid vähendada, mis on andnud ka märkimisväärseid tulemusi. Kuid kord juba keskkonda sattunud plii on endiselt ringluses.

Antud uuringu tulemusel saadud andmed kinnitavad, et varases arengueas plii sattumine organismi põhjustab täiskasvanud rottide käitumises kauakestvaid muutusi. Nii ilmneb suurenenud rahutus, mida tõestas pluss-puuri katse, ja kahjustub kontekstuaalne pikaajaline mälu, nagu ilmnes kontekstuaalse mälu katsest.

Käitumuslikud muutused fikseeriti seejuures loomadel, kelle pliiitase veres katsete toimumise ajaks oli langenud kontrollgrupiga sarnasele tasemele. Sellist plii toime efekti on kirjeldatud üsna sarnaselt ka eelnevalt (Salinas ja Nuff, 2002). Peab siinkohal aga märkima, et sarnased plii toimeilminguid on täheldatud ka inimesel, mida kinnitab uurimus, kus varases lapseas väikeste plii kogustega kokkupuutunud lastel ilmnes tähelepanu puudulikkus, suurenenud emotsionaalsus ja vähenenud mälu ning õppimisvõime (Finkelstein, 1998).

Vaadeldud arenguliste muutustega, mis toimusid plii manustamise tulemusena, vähenes ka *gyrus dentatus* hipokampuse piirkonnas uute rakkude produktsioon. Neid andmeid kinnitab hiljuti *in vitro* läbi viidud uuring, kus leiti, et plii põhjustatuna pidurdub emrüonaalses ajus neuronaalsete tüvirakkude proliferatsioon (Huang ja Schneider, 2004).

Antud uuring kinnitab ka äsja avaldatud andmeid, milles demonstreeriti plii inhibeerivat toimet hipokampaalsele neurogeneesile *in vivo* (Schneider jt, 2005, Gilbert jt, 2005), kuid erinevalt antud uurimusest ei õnnestunud Gilbert jt (2005) näidata BrdU-positiivsete rakkude proliferatsiooni vähenemist 24 tundi pärast viimast BrdU-manustamist rottidele. Peab aga märkima, et Gilbert jt (2005) poolt läbiviidud uuringus manustati BrdU-d korduvalt 12 päeva jooksul. Korduv igapäevane BrdU manustamine ei võimalda aga täpselt hinnata rakkude proliferatsiooni, kuna mitmeid päevi kestev mitmekordse BrdU manustamise tagajärjel märgistatakse rakud erinevate

rakutsükli ajal ja seega ei mõjutata kogu rakkude hulka ainult proliferatsiooni perioodil vaid ka nende diferentseerumisel ja kogu elutsükli vältel (Eich, 2002).

Ühtlasi näitas antud uuring, et aeglustus mitte ainult neuronaalsete prekursorite proliferatsioon vaid plii mõjutas ka uute tekkinud rakkude elulemust ja täiskasvanud neuroniteks küpsemist. Pealegi vähenes pliid saanud loomadel BrdU-positiivsete kalbindiiniga märgistatud rakkude küpsemine täiskasvanud rakkudeks, seejuures noorte postmitootiliste rakkude Tuj1-ga märgistatud rakkude hulk oli aga oluliselt kõrgem. Nende andmete alusel võib eeldada, et plii pärsib noorte postmitootiliste neuronite arengut täiskasvanud neuroniteks. Uuringu andmed näitavad ühtlasi, et neurogeneesi muutustega kaasnes ka suurenenud gliogenees, kuna BrdU-positiivsetest rakkudest moodustus enam astrogliaarakke. Sarnast astrogliaa kasvu ja astrogliaalse valgu GFAP muutunud ekspressiooni on kirjeldatud ka varem (Selvin-Testa jt, 1994; Struzynska jt, 2001).

Kuidas mõjutavad uuringus ilmnenuid uute tekkinud rakkude diferentseerumise muutused hipokampaalseid funktsioone, on suures osas siiski teadmata. Kõik praegu kättesaadavad andmed näitavad, et uute rakkude tekkimine *gyrus dentatus*'es võib olla oluline hipokampaalsete funktsioonide funktsioneerimisele, kuna uued tekkinud rakud, diferentseerudes küpseteks rakkudeks, loovad sünaptilise ühenduse ning integreeruvad hipokampaalsesse tsirkulatsiooni. Sellega tõuseb eeldatavalt täiskasvanud aju plastilisus (Snyder, jt, 2001; Van Praag jt, 2002). Küpsete granulaarsete neuronite vähenemine võib seega vähendada aju neuronaalset plastilisust.

Mitteküpsede, migreeruvate neuronite kuhjumine *gyrus dentatus*'s, võib, teisest küljest, samuti olla oluline, kuna mitteküpsed neuronid suurendavad riski mitteettenähtud migratsiooniks. See tekitab hipokampaalses formatsioonis valesid närviühendusi, põhjustades seeläbi hipokampaalsete funktsioonide häirumist (Scharfman jt, 2002).

Kuni käesoleva ajani ei ole võimalik otseselt omavahel seostada pliid saanud loomadel käitumiskatsetes ilmnenuid rahutust ja kontekstuaalse mälu häiret ning neurogeneesi muutust. Toetudes selles uuringus leitud mälu nõrgenemisele ja

vähenenud neurogeneesile võib samas näha nendevahelisi seoseid. Uuringud näitavad, et CA2 CA1 ja *gyrus dentatus* on oluliselt haaratud kontekstuaalse pikaajalise mälu omandamise ja taastamise (Lee ja Kesner, 2004).

Neurogeneesi mõjutab ka vaheldusrikas keskkond. Vaheldusrikas keskkonnas kasvanud loomad õpivad paremini ja neil on ka kõrgem hipokampaalne neurogenees (Van Praag jt, 1999). Samal ajal, nagu leidsid Schneider jt (2001), kaitseb vaheldusrikas keskkond ka pliist põhjustatud hipokampaalse mälu vähenemise eest.

Nagu näha, mõjutavad hipokampaalset neurogeneesi väga erinevad tegurid, sealhulgas ka plii. Antud uurimuse tulemusel võib väita, et plii toime varases postnataalses perioodis kutsub esile *gyrus dentatuses* püsivat neurogeneesi vähenemist, mis omakorda võib kahjustada hipokampuse funktsioone ja seeläbi kutsuda täiskasvanud loomadel esile käitumishälbeid.

Seega võib järeldada, et plii toime varases postnataalses perioodis tekitab kauakestvaid muutusi ajufunktsioonides.

Inimese seisukohast on oluline teadvustada, et kuigi keskkonnas sisalduvaid väikeseid pliikoguseid ei peeta enam inimesele ohtlikuks, on tegemist organismi kumuleeruva metalliga. Arvestades eelnevate aastate saastatust ja plii pikka poolestusaega (kuni 30 aastat), võib saada pliid tänapäeval väikestes kontsentratsioonides kõikjalt ümbritsevast keskkonnast.

Nagu näitavad uuringud, kujutavad juba plii sellised kontsentratsioonid veres nagu 3-10 µg/dl ohtu laste normaalsele arengule (Canfield jt, 2003).

Käesolevas uuringus leiti otsene seos pliisisalduse ning neuroloogiliste arenguhäirete vahel – suurenenud rahutus ja halvenenud kontekstuaalne pikaajaline mälu.

Analoogseid arengumuutusi lastel on leidnud ka Chiodo jt (2004). Lastel esinenud mäluhäireid on seoses pliiga kirjeldanud ka Fienberg jt (2002).

Neurogeneesi uuring, mis viidi läbi juba täiskasvanud loomadel, kinnitas, et plii aeglustab täiskasvanueas hipokampaalset neurogeneesi ning muudab neuronite fenotüüpi.

Et inimesel pole võimalik selliseid neurogeneesi uuringuid läbi viia, tuleb siinkohal püstitada hüpotees, et inimesel võivad ajus toimuda sarnased hipokampaalse neurogeneesi muutused, mis võivad olla ka nii lastel kui täiskasvanud inimestel ilmneva rahutuse ja kontekstuaalse mäluhäire tekke põhjuseks.

Plii toime epidemioloogilise uuringu läbiviimisel on Shen jt (2001) leidnud, et varases lapseas pliiga kokkupuutumise tagajärjel tekkinud mälu- ja intelligentsihäired kahjustavad laste edasijõudmist nii koolis kui edaspidi tööl. Seejuures on oma uuringus Shen jt (2001) veendunud, et plii pikaajaliste madalate kontsentratsioonide toimel tekkinud neuroloogilised arenguhäired on pöördumatud.

Seega võib kogu maailmas olla plii kahjuliku mõju poolt kahjustatud rohkem lapsi ja täiskasvanuid, kui osatakse arvata ning sellest tulenevalt on tegemist olulise rahvatervise probleemiga.

Pliist põhjustatud neuroloogiliste kahjustuste vältimiseks on tähtis teha ennetustööd. Selleks tuleb teavitada inimesi plii ohtlikust toimest, käivitada plii uuringud nii keskkonnas kui ka inimeste organismis, eeskõige lastel.

Sihtgrupiks peaksid olema eelkõige Eesti suurlinnade lapsed, piirkondlikel ohualadel elavad lapsed, käitumishäirete ja madala õppimisvõimega lapsed.

Seni pole Eestis läbi viidud uuringut, mis selgitaks Eesti laste olukorda. Käesoleva uurimistöö tulemusi hinnates, oleks sellise uuringu läbiviimine aga vägagi vajalik. See annaks võimaluse võrrelda pliisisaldust Eesti lastel veres, juustes ja küüntes teiste riikide, näiteks Rootsi, Saksamaa, ja Ameerika Ühendriikide lastega.

Nii saaks ülevaate olukorrast Eesti lastel ja samuti annab see võimaluse hinnata selle keskkonnamürgi mõjusid Eesti laste käitumisele, mälule ja õppimisvõimele.

7 KOKKUVÕTE JA JÄRELDUSED

Saadud pliiikonsentratsioonid pliigrupi ja kontrollgrupi veres, ajudes ja organites kinnitavad, et suukaudsel manustamisel on pliiioonidel omadus ladestuda neerudesse, maksa ja luukoesse. Veres ja ajus pliiikonsentratsioon kõigub olenevalt plii olemasolust manustatavas toidus või joogivees tõustes kõrgeks manustamise ajal ja langedes peale manustamise lõppemist.

Arenguealised häired olid jälgitavad kahe käitumiskatse tulemustes: pluss-puuri katse tulemused näitavad, et pliid saanud loomadel on kõrgem ärevuse tase kui kontrollloomadel. Kontekstuaalse mälu katse läbiviimisel ja tulemuste analüüsil ilmnes, et pliid saanud loomadel kontekstuaalne mälu on samuti oluliselt halvem kui kontrollloomadel. Seega võib väita, plii mõjutab et kognitiivseid ja emotsionaalseid häired pliid saanud katseloomadel ka täiskasvanueas.

Antud uuring kinnitas, et plii manustamine varases arengueas kutsub esile kauakestvaid muutusi hipokampaalses neurogeneesis.

Tulemused näitavad, et kontrollloomadel ellu jäänud täiskasvanud neuroneid oli oluliselt rohkem kui varases postnataalses perioodis pliid saanud loomadel.

Noorte, ebaküpsete neuronite hulk oli aga pliid saanud loomadel oluliselt suurem, kui kontrolloomadel.

Samuti ilmnes, et pliid saanud loomadel diferentseerus oluliselt suurem hulk neuronaalseid rakke astrogliia rakkudeks kui kontrollloomadel.

Järeldused:

1. Antud uuring kinnitas, et
 - 1.1 Katseloomadele väikestes kogustes plii suukaudsel manustamisel joogivee kaudu on sel omadus ladestuda neerudesse, maksa ja luukoesse. Manustamise lõppedes pliikontsentratsioon organites küll langeb, kuid võrreldes kontroll-loomadega jääb siiski oluliselt kõrgemaks, eriti neerudes ja luukoes;
 - 1.2 katseloomadele väikestes kogustes plii suukaudsel manustamisel joogivee kaudu suureneb pliikontsentratsioon veres ja ajus. Manustamise lõppedes pliikontsentratsioon oluliselt langeb, jäädes kontroll-loomadega võrreldavale tasemele.
2. Plii toime varases postnataalses perioodis põhjustab rahutust ja mäluhäireid katseloomadel täiskasvanueas.
3. Plii toime varases postnataalses perioodis põhjustab hipokampaalse neurogeneesi vähenemist katseloomadel täiskasvanueas.
4. Plii manustamise tagajärjel tekkinud muutused loomade käitumuses ja hipokampaalses neurogeneesis on kauakestvad

Hüpotees: plii toimel võivad ka inimese ajus toimuda antud katses ilmnenud hipokampaalse neurogeneesi muutused, mis võivad olla üheks käitumise- ja mäluhäirete tekke põhjuseks nii lastel kui täiskasvanud inimestel.

8 KASUTATUD KIRJANDUS

Appleton J., Lee K. M., Sawicka Kapusta K., Damek M. and Cooke M., 2000. The heavy metal content of the teeth of the bank vole (*Clethrionomys glareolus*) as an exposure marker of environmental pollution in Poland, *Environmental Pollution*, 110 (3), 441-449

ATSDR, 1999. Draft Toxicological profile for Lead, U.S. Department of Health and Humans Services, August

Basha R., Wei W., Brydie M., Razmiafshari M., Zawia N. H., 2003. Lead-induced developmental perturbations in hippocampal Sp1 DNA-binding are prevented by zinc supplementation: in vivo evidence for Pb and Zn competition, *Int. Devl Neuroscience*, 21, 1-12

Bellinger D., Leviton A., and Sloman J., 1990. Antecedents and correlates of improved Cognitive Performance in children exposed in utero to low lwvwls of lead, *Environmental Health Perspectives*, 89, 5-11

Bellinger D., Leviton A., Waternaux C., Needleman H. and Rabinowitz M., 1988. Low-level lead exposure, social class, and infant development, *Neurotoxicology and Teratology*, Volume 10, Issue 6, 497-503

Bernal J., Lee J. H., Cribbs L. L., Perez-Reyes E., 1997. Full reversal of Pb⁺⁺ block of L-type Ca⁺⁺ channels requires treatment with heavy metal antidotes, *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, V. 282 (1), 172-180

Bonnefoy X., Huel G. and Guéguen R., 1985. Variation de la plombemie en fonction de la contamination par le plomb de l'eau livree a la consommation : Variation of the blood lead level as a result of lead contamination of the subjects drinking water, *Water Research*, 19, 1299-1303

Büsselberg D., 1995. Calcium channels as target sites of heavy metals, *Toxicology Letters*, 82-83, 255-261

Cairney S., Maruff P., Burns C. B., Currie J. and Currie B. J., 2004. Neurological and cognitive impairment associated with leaded gasoline encephalopathy, *Drug and Alcohol Dependence*, 73 (2), 183-188

Cairney S., Maruff P., Burns C., Currie B., 2002. The neurobehavioural consequences of petrol (gasoline) sniffing, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26, 81-89

Calderón-Salinas J. V., Quintanar-Escorcía M.A., González-Martínez M. T., Hernández-Luna C. E., 1999. Lead and calcium transport in human erythrocyte, *Human & Experimental Toxicology*, 18 (5), 327-332

Campbell J. B., Woolley D. E., Vijayan V. K. and Overmann S. R., 1982. Morphologic effects of postnatal Lead exposure on hippocampal development of the 15-day-old rat, *Developmental Brain Research*, 3, 595-612

Canfield R. L., Henderson C. R., Cory-Slechta D. A., Cox C., Jusko T. A., Lanphear B. P., 2003. Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10µg per decilitre, *The New England Journal of Medicine*, 348 (16), 1517-1526

Chiodo L. M., Jacobson S.W. and Jacobson J.L., 2004. Neurodevelopmental effects of postnatal lead exposure at very low levels, *Neurotoxicology and Teratology*, 26 (3), 359-371

Chirenje T., Ma L.Q., Reeves M., Szulezewski M., 2004. Lead distribution in near-surface soils of two Florida cities: Gainesville and Miami, *Geoderma*, 119, 113-120

Cuenot F., Meyer M., Bucaille A. and Guillard R., 2005. A molecular approach to remove lead from drinking water, *Journal of Molecular Liquids*, 118 (1-3), 89-99

Cui Y.-J., Zhu Y.-G., Zhai R.-H., Chen D.-Y., Huang Y.-Z., Qiu Y., Liang J.-Z., 2004. Transfer of metals from soil to vegetables in an area near a smelter in Nanning, China, *Environment international*, 30, 785-791

Dugo G., La Pera L., Pellicano T.-M., Di Bella G., D'Imperio M., 2005. Determination of some inorganic anions and heavy metals in D.O.C. Golden and

Amber Marsala wines: statistical study of the influence of ageing period, colour and sugar content, *Food Chemistry*, 91, 355-363

Eesti geoloogiline kaart, 2003

Eich A. J., 2002. Adult Neurogenesis: implications for psychiatry, *Progress in Brain Research* (M. A. Hofman, G. J. Boer, A. J. G.D. Holtmaat, E. J. W. van Someren, J. Verhagen and D. F. Swaab, Eds), 138, 317-344

Eriksson P. S., Perfilieva E., Björk-Eriksson T., Alborn A.-M., Nordborg C., Peterson D. A., Gage F. H., 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus, *Nature Medicine*, 4-11, 1313-1317

Fat L. and Coldea V., 1998. The modification of blood calcium and blood magnesium in the professional exposure to lead, *Toxicology Letters*, 95 (1), 128

Fewtrell L. J., Prüss-Üstün A., Landrigan P. and Ayuso-Mateos J. L., 2004. Estimating the global burden of disease of mild mental retardation and cardiovascular diseases from environmental lead exposure, *Environmental Research*, 94(2), 120-133

Fienberg S. E., Glymour C., Scheines R., 2003. Expert statistical testimony and epidemiological evidence: the toxic effects of lead exposure on children, *Journal of Econometrics*, 113, 33-48

Finkelstein Y., Markowitz M. E. and Rosen J. F., 1998. Low-level lead-induced neurotoxicity in children: an update on central nervous system effects, *Brain Research Reviews*, 27 (2), 168-176

Fullmer C. S., 1997. Lead-Calcium Interactions: Involvement of 1,25-Dihydroxyvitamin D, *Environmental Research*, 72-1, 45-55

Gilbert M., Kelly M., Samsam T., Goodman J., 2005. Chronic developmental lead exposure reduces neurogenesis in adult rat hippocampus but does not impair spatial learning, *Toxicological Sciences*, electronic publication ahead of print.

Gomes V. E., Sousa M. L. R., Barbosa F. Jr, José Krug F. Jr., Saraiva M. C. P., Cury J. A. and Gerlach R. F., 2004. In vivo studies on lead content of deciduous teeth

superficial enamel of preschool children, *Science of The Total Environment*, 320, 25-35

Gould E. and Gross C. G., 2002. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems, *The Journal of Neuroscience*, 22 (3), 619-623

Hackley B. and Katz-Jacobson A., 2003. Lead poisoning in Pregnancy: a case study with implications for Midwives, *Journal of Midwifery & Womens Health*, 48, 30-38

Hande G.-O., Handan U. S. and Hilal Ö., 2004. Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers, *Toxicology*, 195 (2-3), 147-154

Haraguchi, T; Ishizu, H; Takehisa, Y; Kawai, K; Yokota, O; Terada, S; Tsuchiya, K; Ikeda, K; Morita, K; Horike, T; Kira, S; Kuroda, S, 2001. Lead content of brain tissue in diffuse neurofibrillary tangles with calcification (DNFTC): the possibility of lead neurotoxicity, *Neuroreport*, 12 (18), 3887-3890

Huang F. and Schneider J. S., 2004. Effects of Lead Exposure on Proliferation and Differentiation of Neural Stem Cells Derived from Different Regions of Embryonic Rat Brain, *NeuroToxicology*, 25 (6), 1001-1012

Höring H., Englert N., Krause C., Meyer E., Nagel M., Schiller F., 1992. Germany: lead in drinking-water and blood: a study of schoolchildren from Southern Saxonia, Human exposure to Lead, Report on the Human Exposure assessment Location (HEAL) Programme Meeting held in Bangkok, Thailand, 99-109

Kaufmann R. B., Staes C. J., and Matte T. D., 2003. Deaths related to lead poisoning in the United States, 1979-1998, *Environmental Research*, 91, 78-84

Kempermann G., 2002. Why New Neurons? Possible Functions for Adult Hippocampal Neurogenesis, *The Journal of Neuroscience*, 22(3), 635-638

Kiipli T., Orlova K., 1996. Salakavalad metallid linnaaias, *Eesti Loodus* 5/6, 164-165

Kärblane H., Kangur J., Kevvai L., 2000. Mõnede raskmetallide ja mikroelementide sisaldus Eesti põllumuldades ning taimedes, Eesti põllumaj. Min ja Eesti Maaviljeluse inst., Saku, 33-48; 60-65

Lahn M., Sing W., Nazario S., Fosberg D., Bijur P. and Gallagher E. J., 2003. Increased blood lead levels in severe smoke inhalation, The American Journal of Emergency Medicine, 21 (6), 458-460

Lee I., Kesner R. P., 2004. Differential contribution of dorsal hippocampus subregions to memory acquisition and retrieval in contextual fear-conditioning, Hippocampus, 14, 301-310

Leighton J., Klizman S., Sedlar S., Matte T., Cohen N. L., 2003. The effect of lead-based paint hazard remediation on blood lead levels of lead poisoned children in New York City, Environmental Research, 92, 182-190

Lin Z., Harsbo K., Ahlgren M., Qwarfort U., 1998. The source and fate of Pb in contaminated soils at the urban area of Falun in central Sweden, Science of The Total Environment, 209, 47-58

Linnamägi Ü., 1998. Changes in local cerebral blood flow and lipid peroxidation following lead exposure in experiment, Department of Neurology and Neurosurgery, University of Tartu, Tartu, Estonia Tartu University Press

Lippmaa E., Pihlak A., 1992. Mikroelementidest Eesti põhja-ja mineraalvetes, Geoloogia Instituut, Pöördumine EV SM, 29.12.92, nr. 2-19/397, 1-5

Mander Ü., Oja P., 1999. Keskkonna-ja Sotsiaalmajanduslike mõjude hindamise aruanne, Eesti Vabariigi Maanteeamet, TÜ geograafia instituut

Mayer M. G. and Wilson D. N., 1998. Health and safety-the downward trend in lead levels, Journal of Power Sources, 73 (1), 17-22

Mayer P. A., McGeehin M. A., Falk H., 2003. A global approach to childhood lead poisoning prevention, International Journal of Hygiene and Environmental Health, 206, 363-369

- Morgan M. A., Pfaff D. W., 2002. Estrogen's effect on activity, anxiety, and fear in two mouse strains, *Behavioural Brain Research*, 132, 85-93
- Nation J. R., Smith K. R., Bratton G. R., 2004. Early developmental lead exposure increases sensitivity to cocaine in a self-administration paradigm, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 77, 127-135
- Needelmann L. H., McFarland C., Ness R. B., Fienberg S. E, Tobin M. J., 2002. Bone lead levels in adjudicated delinquents. A case control study, *Neurotoxicology and Teratology*, 24, 711-717
- Ng A. and Patterson C., 1981. Natural concentrations of lead in ancient Arctic and Antarctic ice, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 45 (11), 2109-2121
- Nottebohm F., 2002. Why Are Some Neurons Replaced in Adult Brain?, *The Journal of Neuroscience*, 22(3), 624-628
- Petrosjan V., Orlova A., Dunlap C. E., Emil Babayan, Mark Farfel and Margrit von Braun, 2004. Lead in residential soil and dust in a mining and smelting district in northern Armenia: a pilot study' *Environmental Research*, 94 (3), 297-308
- Pihlak A, 1994. Kunda puurkaevude vetest ja nendest erituvatest gaasidest, "Eesti Projekt", *Geoloogia instituut*, 1-5
- Ping-Chi H. and Yueliang Leon G., 2002. Antioxidant nutrients and lead toxicity, *Toxicology*, 180 (1), 33-44
- Riiklik keskkonnaseire programm, 2003, Raskmetallide sadenemise bioindikatsiooniline hindamine, *Õhuseire alamprogramm*, 16
- RTL 40, 662, 2004. Pinnases ja põhjavees ohtlike ainete sisalduse piirnormid
- RTL 100, 1369, 2001. Joogivee kvaliteedi-ja kontrollinõuded ning analüüsimeetodid
- Sakai T., 2000. Biomarkers of lead exposure, *Industrial Health*, 38 (2), 127-142

- Salinas J. A., Huff N. C., 2002. Lead and conditioned fear to contextual and discrete cues, *Neurotoxicology and Teratology*, 24 (4), 541-550
- Scharfman H. E., Sollas A. L., Goodman J. H., 2002. Spontaneous recurrent seizures after pilocarpine-induced status epilepticus activate calbindin immunoreactive hilar cells of the rat *gyrus dentatus*, *Neuroscience*, 111, 71-81
- Schneider J. S., Lee M. H., Anderson D. W., Zuck L. and Lidsky T. I., 2001. Enriched environment during development is protective against lead-induced neurotoxicity , *Brain Research*, 896 (1-2), 48-55
- Schors T. J., Townsend D. A., Zhao M., Kozorovitsky Y., Gould E., 2002. Neurogenesis relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning, *Hippocampus*, 12, 578-584
- Selvin-Testa A., Loidl C. F., Lopez-Costa J. J., Lopez E. M., Pecci-Saavedra J., 1994. Chronic lead exposure induces astrogliosis in hippocampus and cerebellum, *Neurotoxicology*, 15, 389-401
- Sezgin N., Kurtulus O. H., Demir G., Nemlioglu S., Bayat C., 2003. Determination of heavy metal concentrations in street dusts in Istanbul E-5 highway, *Environment International*, 29, 979-985
- Shen X.-M., Wu S.-H. and Yan C.-H., 2001. Impacts of low-level lead exposure on development of children: recent studies in China, *Clinica Chimica Acta*, 313, 1(2), 217-220
- Snyder, J. S., Kee N., Wojtowicz J. M., 2001. Effects of adult neurogenesis on synaps plasticity in the rat *gyrus dentatus*, *Journal of Neurophysiology*, 85, 2423-2431
- Soldin O. P., Hanak B., Soldin S. J., 2003. Blood lead concentrations in children: new ranges, *Clinica Chimica Acta*, 327, 109-113
- Stark M., Wolff J. E. A. and Korbmacher A., 1992. Modulation of glial cell differentiation by exposure to lead and cadmium, *Neurotoxicology and Teratology* 14 (4), 247-252

- Struzynska L., Bubko I., Walski M., Rafalowska U., 2001. Astroglial reaction during the early phase of acute lead toxicity in the adult rat brain, *Toxicology*, 165, 121-131
- Zawia N. H. and Harry G. J., 1996. Developmental Exposure to Lead Interferes with Glial and Neuronal Differential Gene Expression in the Rat Cerebellum, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 138 (1), 43-47
- Zharkovsky A., Zharkovsky T., Kaasik A., Jaako K., 2003. Neurodegeneration and production of the new cells in the *gyrus dentatus* of juvenile rat hippocampus after a single administration of ethanol, *Brain Research*, 978, 115-123
- Zietz B., Dassel de Vergara J., Kevekordes S. and Dunkelberg H., 2001. Lead contamination in tap water of households with children in Lower Saxony, Germany; *The Science of The Total Environment*, 275 (1-3), 19-26
- Takagi Y., Matsuda S., Imai S., Ohmori Y., Masuda T., Vinson J.A., Mehra M. C., Puri B. K., and Kaniewski A., 1986. Trace Elements in Human Hair: An International Comparison, *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, 36, 793 – 800
- Tong S. T. Y. and Lam K. C., 2000. Home sweet home? A case study of household dust contamination in Hong Kong, *The Science of The Total Environment*, 256 (2-3), 115-123
- Tvinnereim H. M., Eide R. and Riise T., 2000. Heavy metals in human primary teeth: some factors influencing the metal concentrations, *The Science of The Total Environment*, 255 (1-3), 21-27
- Walsh M. P., 2001. Sales of Leaded Gasoline, *Carlines*, 4, 1
- Van Praag H., Christie B.R., Sejnovski T. J., Gage F. H., 1999. Running enhances neurogenesis, learning and long-term potentiation in mice, *PNAS*, 96, 13427-13431
- Van Praag H., Schinder A. F., Christie B.R., Toni N., Palmer T. D., Gage F. H., 2002. Functional neurogenesis in the adult hippocampus, *Nature*, 415, 1030-1034

Watt G. C. M., Britton A., Gilmour H. G., Moore M. R., Murray G. D. and Robertson S. J., 2000. Public health implications of new guidelines for lead in drinking water: a case study in an area with historically high water lead levels, *Food and Chemical Toxicology*, 38, S73-S79

West M. J., 1993. New Stereological Methods for Counting Neurons, *Neurobiology of Aging*, 14, 275-285

WHO 1995. Environmental Health Criteria 165: Inorganic Lead, International Programme on Chemical Safety, World Health Organisation, Geneva, Switzerland

WHO, 1984. Guidelines for Drinking Water, Vol.2, Part III. Health-related Inorganic Constituents, Lead, 111-119

WHO, 1993. Guidelines for drinking water quality. 2nd edition, 1: Recommendations, Geneva: World Health Organisation, 49-50

WHO, 2001. Air Quality Guidelines, 2nd edition, Chapter 6.7 Lead, Copenhagen: World Health Organisation

Willows N.D. and Gray-Donald K., 2002. Blood lead concentrations and iron deficiency in Canadian aboriginal infants, *The Science of The Total Environment*, 289, 255-260

Välisõhu seire, 2003. Välisõhu seire Kirde-Eesti linnades. Aastaruanne, Riikliku Keskkonnaseire alamprogramm, Tallinn, Eesti Keskkonnauuringute Keskus.

Xingquan Z., Shilin C., Jiangrong L., 1992. Lead exposure and its effects on preschool children in Beijing, *Human exposure to Lead, Report on the Human Exposure assessment Location (HEAL) Programme Meeting held in Bangkok, Thailand*, 57-71

Effect of Lead exposure on the behaviour and neurogenesis in the brain
Experimental study

SUMMARY

Lead (Pb) poisoning is a major environmental problem of public concern. Chronic low-level exposure of the pediatric population can result in subtle neurobehavioral deficits. New data indicate significant adverse effects of lead exposure in children at blood lead levels previously believed to be safe. Some adverse health effects have been documented at blood lead levels at least as low as 10 µg/dL of whole blood.

In this study the effects of lead (Pb) exposure during development (postnatal days 1-30), on the emotional reactivity, contextual fear memory and neurogenesis in the *gyrus dentatus* of 60-80 days-old rats, were studied. Rat dams were exposed to Pb, with a 0,2 % Pb acetate solution in drinking water for 30 days, starting from the 1st postnatal day. At postnatal day 60 and 80, the animals received BrdU injections and the generation of the new cells in the *gyrus dentatus* of hippocampus was determined. In parallel experiments, the survival and differentiation patterns of the newly generated cells, within the *gyrus dentatus* after Pb exposure, were also studied. The results of the present study demonstrate, that developmental Pb exposure induces, in weaned pups, an increased anxiety and inhibition of contextual fear conditioning. Developmental Pb exposure reduced generation of the new cells in the *gyrus dentatus* and their survival. The pattern of differentiation of the BrdU-positive cells was also altered in Pb exposed rats. A lower proportion of BrdU-positive cells demonstrated co-localisation with the marker for adult neurons calbindin. In contrast, the proportions of young not fully differentiated neurons and proportions of astroglial cells, generated from newly born cells, were increased in Pb-exposed rats.

Our data show that Pb exposure, during the early postnatal period, induces persistent inhibition of neurogenesis within the *gyrus dentatus*, which might affect hippocampal functions and at least, in part contribute to the Pb-induced behavioral deficits.

TÄNU

Eesti Teadusfond, grant nr. 5326 ja 6504.

Täna südamest:

- ❖ Juhendajaid Aleksander Zarkovskit ja Eda Merisalu abi, tähelepanekute ja nõuannete eest ning Aleksander Zarkovskit meetoodilise abi eest
- ❖ Tamara Zharkovskit ja Ülla Petersoni igakülgse abi eest
- ❖ Farmakoloogia instituudi doktorante Külli Jaako-Movits'it, Lenne-Triin Heidmetsa ja Olga Romantshikut abi eest katsete ja andmetöötluste läbiviimisel
- ❖ Tallinna Tehnikaülikooli Keemiainstituudi vanemteadurit Anu Viitak'i vereanalüüside tegemise eest
- ❖ Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudi vanemteadurit Arno-Toomas Pihlakut abi eest kirjanduse saamisel
- ❖ pereliikmeid

AVALDAMISELE SAADETUD PUBLIKATSIOON

Zharkovsky A., Jaako-Movits K., Zharkovsky T., Romantchik O., Jurgenson M., Merisalu E., Heidmets L.-T., 'Lead exposure during postnatal period impairs contextual fear conditioning and reduces adult hippocampal neurogenesis in the rat brain', Submitted 05.05.2005, *International Journal of Developmental Neuroscience (Elsevier Editorial System)*

**LEAD EXPOSURE, DURING POSTNATAL PERIOD, IMPAIRS
CONTEXTUAL FEAR CONDITIONING AND REDUCES ADULT
HIPPOCAMPAL NEUROGENESIS IN THE RAT BRAIN**

Alexander Zharkovsky^{1*}, Külli Jaako-Movits¹, Tamara Zharkovsky¹, Olga
Romantchik¹, Monika Jurgenson², Eda Merisalu², Lenne-Triin Heidmets¹

¹Department of Pharmacology and ²Department of Public Health, University of Tartu,
511014 Tartu, Estonia.

Author for correspondence:

Alexander Zharkovsky
Professor of Pharmacology
Department of Pharmacology
University of Tartu
19 Ravila Street, 51014 Tartu, Estonia
Phone: +372-7-374351
Fax: +372-7-374352
E-mail: aleksander.zarkovski@ut.ee

Abstract.

The effects of lead (Pb) exposure during development, (postnatal days 1-30), on the emotional reactivity, contextual fear memory and neurogenesis in the dentate gyrus of 60-80 days-old rats, were studied. Rat dams were exposed to Pb, with a 0.2% Pb acetate solution in drinking water for 30 days, starting from the 1st postnatal day. At postnatal days 60 and 80, the level of anxiety and contextual fear acquisition, were respectively studied. At postnatal day 80, the animals received BrdU injections and the generation of the new cells in the dentate gyrus of hippocampus was determined. In parallel experiments, the survival and differentiation patterns of the newly generated cells, within the dentate gyrus after Pb exposure, were also studied. The results of the present study demonstrate that developmental Pb exposure induces, in weaned pups, an increased anxiety and inhibition of contextual fear conditioning. Developmental Pb exposure reduced generation of the new cells in the dentate gyrus, and their decreasing survival. The pattern of differentiation of the BrdU-positive cells was also altered in Pb-exposed rats. A lower proportion of BrdU-positive cells demonstrated co-localization with the marker for adult neurons calbindin. In contrast, the proportions of young not fully differentiated neurons and proportions of astroglial cells, generated from newly born cells, were increased in Pb-exposed rats. Our data show that Pb exposure, during the early postnatal period, induces persistent inhibition of neurogenesis within the dentate gyrus, which might affect hippocampal functions and at least, in part, contribute to the Pb-induced behavioral deficits.

Key words: Lead exposure; contextual fear conditioning; hippocampal neurogenesis

Running title: Lead exposure and hippocampal neurogenesis

1. Introduction.

It has been long understood that various environmental factors like stress, pharmacological drug treatment or toxin exposure, taking place early in life, have a profound influence on brain development, producing persistent effects on its function and increasing vulnerability for psychic disorders in adulthood (Ikonomidou et al., 2000; Roceri et al., 2002). Lead (Pb) is widely distributed in the environment, and the consequences of chronic exposure to low levels of Pb in childhood have been a matter for extensive research during recent years. All current evidence suggests that there is no threshold below which Pb remained without effect. Exposure to low levels of lead (Pb), during early development, has been implicated in long-lasting behavioral abnormalities and cognitive deficits in children and experimental animals (Bourjeily 1997; Murphy et al., 1999; Finkelstein et al., 1998; Moreira et al., 2001; Canfield et al., 2003). The learning impairment, and other behavioral disturbances in affected children and laboratory animals, suggests that hippocampus might be one region adversely affected during early life. Indeed, recent findings demonstrated that early Pb exposure disrupts expression and phosphorylation of the cAMP-responsive element binding protein (pCREB), a transcription factor directly related to the neuronal plasticity in the hippocampus of juvenile rats (Toscano, 2003). Furthermore, early Pb exposure altered the N-methyl-D-aspartate receptor subunit composition in favor of the prevalence NR2B receptor subunit and decreased expression of the NR 2A subunit, which might be important in hippocampal development and maturation (Toscano et al., 2002). The possible reduction of neuronal plasticity, caused by Pb exposure, is also reflected by the altered hippocampal long-term potential (Xu et al., 1998).

In rodents, among brain structures, the hippocampal formation differs from other brain structures because approximately 85% of granule neurons of the dentate gyrus are produced during the postnatal period and adult neurogenesis persists through the whole life span (Altman J., 1962; Cameron et al., 1993; Hastings et al., 2001). It has been hypothesized that adult hippocampal neurogenesis exists as a substrate for neuronal plasticity and is related to the memory formation, emotion and helps the brain to accommodate continued bouts of novelty (Kempermann, 2002). Several negative events occurring during early childhood, such as maternal deprivation, ethanol administration, impair cognitive functions and induce long-lasting alterations

of hippocampal neurogenesis (Lemaitre et al., 2000; Jaako et al. 2003). If the disruption of hippocampal neurogenesis persists in adulthood this might diminish the plasticity of the hippocampus and finally enhance the likelihood of mood and memory disorders (Jacobs et al., 2000).

Based on the above considerations, the aim of the present study was to study whether low-level Pb exposure, during the early postnatal period, would induce emotional and cognitive dysfunctions and alterations in the hippocampal neurogenesis in adulthood.

2. Materials and methods.

Experiments conformed to local and international guidelines on the ethical use of animals, and all efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Wistar rats were obtained from Kuopio Animal Research Center (Finland) and used as the parent generation. Adult female rats (70-80 days old) were individually housed in plastic cages with a 22° C, and 12-h light-dark cycle and were mated with males of the same strain. One day after parturition, litters were culled to 8 pups. On the same day, the water was replaced by a 0.2% solution of Pb acetate for a period of 30 days. The treatment lasted during whole lactation period and continued until the age of 30 days. Pups were weaned at the age of 21 days and than were kept in a group of 5 males per cage. At postnatal day 30, Pb was removed from the drinking water, and the animals were allowed to attain adulthood (postnatal day 60). The control group dams and pups remained on tap water. Pup weights, maternal and pups' fluid and food consumption were measured on a weekly basis. During the whole experiment, animals were fed with regular laboratory foodstuff.

On days 15, 30, 60 and 80 after birth, separate groups of animals (3-4 per group) were taken for Pb determination in blood and brain tissue. Animals were anesthetized with chloral hydrate and blood was taken from the heart. Animals then were perfused with physiological saline and the brain was removed. The blood samples and brain tissue were immediately frozen at -70°C. Quantitative analysis of lead levels was performed in an independent State Environmental Laboratory using a Perkin-Elmer 1100B atomic adsorption spectrometer with a Philips HGA/P3105 graphite furnace and a deuterium background corrector.

Behavioral testing

Behavioral testing was performed on male pups at the age 60 days (locomotor activity and anxiety testing) and 80 days (contextual fear conditioning).

General locomotor activity was determined in a rectangular wooden cage (50 x 50 x 50 cm) uniformly illuminated with dim light. The light sensitive video camera, connected to the computer, was mounted about 1 m above the observation cage and locomotor activity of an animal was monitored and analyzed using VideoMot2 software (TSE Systems, Germany) during a 30-minute observation period.

Anxiety was evaluated in the elevated plus maze. The elevated plus maze behavior was assessed using an apparatus consisting of two open and two enclosed arms of equal length and width (50×10 cm). The enclosed arms are not entirely enclosed, but rather have walls that extend 40 cm high. The plus maze was elevated 50 cm above the floor. Each rat was placed in the center of the elevated plus maze facing one of the open arms, and the number of entries and time spent (seconds) in the open or closed arms were recorded during a 5-min test period. The elevated plus maze was carefully cleaned with 5% ethanol before each animal was introduced. Data was quantified and presented as a % time spent in the open arms and % entries in the open arms.

Contextual fear conditioning. At postnatal day 80, control animals and Pb-exposed animals were trained for the contextual fear conditioning. The study was performed between 09.30a.m. - 14.00p.m. The task was carried out during four consecutive days in the experimental chamber (220x160x160mm; L x W x H). Three sides of the box are made of non-transparent plastic and the fourth side is made of transparent plastic. The floor was made of stainless steel rods connected to a shock delivery apparatus. Rats were placed in the experimental chamber for 5min and allowed to explore. The duration of the freezing state (defined as complete immobility) and the number of freezing episodes was measured by two independent observers. Next, the animals were submitted to electric shocks (0,8 mA, 10 sec duration) on three feet, at 60 sec intervals between each shock, and were removed from the apparatus 1 min after the last foot shock. Contextual conditioning tests were performed 24h, 48h and 72h after training. Animals were placed in the same context, and no foot shocks were delivered. The total duration of freezing episodes was recorded during 5min. Data was quantified and presented as a mean time of freezing.

Neurogenesis

At the age of 80 days, both control and Pb-exposed pups were administered bromodeoxyuridine (BrdU, 100 mg/kg, i.p., Boehringer Mannheim) three times, with an interval of 2 hours, in a volume of 0.4 ml/100 g body weight. BrdU is a thymidine analog, which is incorporated during the S phase of the cell cycle and widely used to label dividing cells. The total dose BrdU, 300 mg/kg allowed maximum labeling of the dividing progenitors. Twenty-four hours after the last administration of BrdU, groups of control (n=6), or lead-exposed (n=6) animals were killed and their brains were taken for immunohistochemical detection of the newly born cells or neuronal death. To determine the survival and differentiation patterns of the newly born cells additional groups of animals (n=6) were administered BrdU and their brains were processed for the immunohistochemical detection BrdU label, or double immunohistochemistry for BrdU, and neuronal or glial markers at three weeks following BrdU administration.

For immunohistochemical studies, animals were deeply anesthetized with chloral hydrate (300 mg/kg, i.p.) and transcardially perfused with normal saline and then with 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS, 0.1M, pH=7.4). After a post-fixation for 24 hours of the brain in paraformaldehyde/PBS solution, coronal sections 40 μ M thick were cut on a vibratome (Leica VT1000, Germany), collected in PBS and kept (approximately 1 week) in multiwell 24-well plates in the refrigerator at +4°C until processed for immunohistochemistry.

Immunohistochemistry. For BrdU immunohistochemistry, the free-floating sections were incubated in 0.3% H₂O₂ in PBS for 30 min, followed by incubation in a 0.1M TRIS HCl (pH=7.4) buffer containing 0.025% trypsin and 0.1% CaCl₂ for 10 min. Thereafter, the sections were incubated in 2N HCl in PBS at 37°C for 30 min, then in 0.1 M boric acid in PBS for 5 min, and blocked in the mixture of 2% normal horse serum and 2% normal goat serum in PBS containing 0.3% Triton X-100 for 1 hour. This was followed by overnight incubation at 4°C with mouse monoclonal antibody to BrdU (1:200; Boehringer Mannheim, Germany) diluted in blocking buffer. After being washed in PBS, sections were incubated in biotinylated horse anti-mouse antibody (rat adsorbed, 1:50, Vector Laboratories, UK) diluted in blocking buffer for

1 hour. BrdU-positive cells were visualized using the peroxidase method (ABC system and diaminobenzidine as chromogen, Vector Laboratories). The sections were counter-stained using cresyl violet, dried, cleared with xylol and cover-slipped with mounting medium (Vector Laboratories).

For immunofluorescent double-labeling, sections were incubated with a mixture of rat anti-BrdU monoclonal antibody (1:400, Accurate Chemical Scientific Corp., USA) and with either mouse anti-Tuj1 (1:200, neuronal class III β -tubulin, marker for young neurons), rabbit anti-calbindin (marker for adult neurons) polyclonal antibody (1:200), or mouse anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein, marker for astrocytes) monoclonal antibody (1:1000). Antibodies were purchased from Chemicon International, UK. After washing, the sections were incubated with the secondary antibodies for 1 hour. Secondary antibodies were: goat anti-rat conjugated with Alexa-488, biotinylated anti-mouse IgG (Vector Laboratories) followed by streptavidin-Alexa-594, rabbit anti-mouse-Alexa-594 and goat anti-rabbit-Alexa-594, respectively (1:1000; Molecular Probes, The Netherlands). Fluorescent signals were detected using a laser confocal microscope MRC-1024 (Olympus /Bio-Rad, Germany) equipped with an argon-krypton laser. 3D images were constructed from a series (12-15) of scans at 1 μ m intervals and further analyzed for the co-localization of BrdU signal with the signals of neuronal or glial markers.

Fluoro-Jade staining was used for the detection of the occurrence of the neuronal death. Brain sections were briefly immersed in 100% ethanol for 3 min and re-hydrated through graduated alcohol solutions. Sections were then incubated in 0.06% potassium permanganate solution for 15 min, rinsed with distilled water, and incubated in a solution of 0.001% Fluoro-Jade (Histo-Chem, Jefferson, USA) in 0.1% acetic acid for 30 min. Sections were then rinsed in water, air-dried, cleared in xylene coverslipped and examined with an epifluorescence microscope with the filter designed to detect fluorescein.

Cell counting. The BrdU-positive cell numbers were estimated according to the stereological principles (Gundersen et al., 1987) using an optical disector method (West, 1988; West et al., 1991). For each animal, BrdU-positive cells (peroxidase staining) were counted in one-in-ten sections throughout the rostro-caudal extent of the dentate gyrus. The first section was chosen randomly from the first ten sections. The images of the dentate gyrus were acquired with the objective x60 oil (numerical

aperture 1.4) on a microscope BX-51 (Olympus, Germany) equipped with x,y,z motorized stage (Prior Scientific, UK), linear focus encoder ND 281B (Heidenhain, Germany) and DXC-950P 3-CCD Sony color video camera. For each animal, BrdU-positive cells (peroxidase staining) were counted in one-in-ten sections within the dentate gyrus modifying the optical disector procedure to exclude the top focal plane only. An average of 8 sections was analysed from each animal. To estimate the total number of BrdU-positive cells in a given region the sum of cell counts, from 8 sections, were then multiplied by 10. Left and right dentate gyri were analysed separately and the estimates were averaged for each animal.

The volumes of the dentate gyrus were calculated according to the Cavalieri estimation determined by summing corresponding areas using stereology based CAST software (Olympus, Denmark) for each section, multiplied by the distance between sections sampled.

Determination of the phenotypes of the BrdU-positive cells.

Between four and five sections, from control and Pb-exposed animals surviving three weeks after the BrdU injection were double labeled and analyzed by laser confocal microscopy (Olympus/BioRad MRC 1024). BrdU-positive cells were analyzed for co-expression of BrdU and Tuj1, BrdU and calbindin and for BrdU and GFAP. The data were expressed as a percentage of BrdU-positive cells expressing the phenotype marker. In total, 50-100 BrdU-positive cells for each animal (n=4) were analyzed for co-localization and percentages of BrdU-positive cells, co-expressing corresponding markers, were calculated. From these data the mean \pm SEM were calculated. The double labeling experiments do not permit direct calculations of absolute cell numbers, per volume of tissue, due to the methodological problems related to the variations in the penetrations of antibodies, section thickness, sampling etc.

Data analysis.

Data were expressed as MEAN \pm SEM and statistical comparisons were made using either one-way ANOVA followed by the Bonferroni test or a Student's t-test where appropriate.

3. Results.

Table 1 shows the mean Pb levels in the blood and brain of pups during the period of Pb administration and afterwards. Pb exposure during the lactation period resulted in significantly high levels of Pb in blood and brain tissue. These values corresponded to those observed by others (Trombini et al., 2001; Salinas and Huff, 2002). After termination of Pb administration, the levels of Pb in blood and brain decreased and, at postnatal days 60 and 80, did not differ significantly from the levels found in control rats. The Pb administration protocol employed here did not affect the weight gain as compared to control (data not shown). Fluid consumption, however, was slightly reduced in Pb-exposed animals during the whole period of Pb administration.

Behavior of Pb-exposed rats.

The Locomotor activity test did not reveal any differences between Pb-exposed and control animals in the distance (cm) traveled or mean speed (cm/sec) at any time point during a 30-min-observation period (Fig. 1).

Plus-maze test. Pb-exposed animals demonstrated an increase in the level of anxiety as evidenced by a reduction of %entries onto and % time spent in the open arms of the plus-maze (Fig. 2). The observed reductions in the measures of anxiety were not attributed to the changes in the locomotor activity in the plus-maze since the total number of entries did not differ between control and Pb-exposed rats (Fig. 2).

Contextual fear conditioning test. The baseline freezing time, prior to conditioning in Pb-exposed animals, was 25.7 ± 6.8 (n=9) and did not significantly differ from those found in control rats - 20.4 ± 4.6 (n=9). For the assessment of retention and extinction of fear, animals were placed in the same context at 24, 48 and 72 hours after presentation of unconditioned stimulus (foot-shock), in the same context, and were scored for freezing during a 5min observation period. Lead-exposed rats demonstrated a significant impairment of long-term contextual fear memory. One-way ANOVA for repeated measures demonstrated a significantly lower freezing time in Pb-exposed rats (ANOVA; $F_{(5, 41)}=14.47$, $P<0.01$). Post-hoc analysis revealed significant reduction in freezing time at 24 and 48 but not at 72 hours following training, as compared with control pups (Figure 3).

Neurogenesis

To examine the potential effect of early Pb exposure on the proliferation of the neuronal and/or glial precursors in control and Pb-exposed rats during adulthood, 80-days-old animals were administered a proliferation marker BrdU (300 mg/kg, total dose) and the number of BrdU-positive cells in the dentate gyrus was estimated 24 hours later. BrdU-positive nuclei of both control and Pb-exposed rats appeared as irregularly shaped clusters of 2-3 cells located in the border between the granule cell layer and hilus (Figure 4A, B). The number of BrdU-labeled cells was significantly ($p < 0.01$) lower in Pb-exposed rats as compared to controls (Figure 4C). The reduced proliferative activity in the dentate gyrus has not been associated, however, with the changes of the volume of dentate gyrus (Figure 4D).

To determine the survival rate of BrdU-positive cells after Pb exposure, we counted the number of BrdU-positive cells in the dentate gyrus three weeks after BrdU administration. Experiments failed to demonstrate any differences in the survival rate of BrdU-positive cells between control and Pb-exposed animals. The percentage of surviving cells in Pb-exposed rats was 39.4% and did not differ significantly from those in control animals – 47.8% ($n=6$).

To determine the phenotype of BrdU-positive cells, born in the dentate gyrus of control or Pb-exposed rats, we performed double immunohistochemical labeling for BrdU and markers for neuronal or glial phenotypes 3 weeks after administration of BrdU (Figure 5). Table 2 shows that in control rats $40.6 \pm 3.4\%$ of survived BrdU positive cells expressed the marker of adult granule neurons calbindin, whereas in Pb-exposed animals only $28.7 \pm 3.5\%$ of cells became adult calbindin-positive neurons ($p < 0.05$). By contrast, the proportion of young post-mitotic neurons expressing TuJ1 was significantly higher ($p < 0.01$) in Pb-exposed rats as compared with those in the control sample. In addition, a significantly higher proportion of BrdU-positive cells in the dentate gyrus of Pb-exposed rats has been differentiated into astroglia as compared to controls.

4. Discussion

The data obtained in this study show that early lead exposure results in the persistent changes in behavior in rats, for example, an increased anxiety in the plus-maze test and disrupted contextual fear memory conditioning. The behavioral alterations were observed during an extended period following termination of lead administration. At that time, the concentrations of lead returned to the levels seen in control animals and therefore we propose that Pb exposure induces long-lasting or even permanent alterations in brain functions. The observed behavioral syndrome in rats is very similar to those described by others (Salinas and Nuff, 2002) and are in agreement with observations on humans where children exposed to low levels of lead display attention deficit, increased emotional reactivity and impaired memory and learning (Fikelstein, 1998).

The observed behavioral alterations, following Pb exposure, were accompanied by the inhibition of the production of the new cells in the dentate gyrus of the hippocampus. These data are consistent with recently found Pb-induced retardation of proliferation of the neural stem cells derived from embryonic brain in vitro (Huang and Schneider, 2004). Our study confirms very recent data, which demonstrates the inhibitory action of Pb on hippocampal neurogenesis in vivo (Schneider et al., 2005; Schneider et al., 2005). In contrast to our study, Gilbert et al., (2005) failed to demonstrate the reduction in BrdU-positive proliferating cells when measured 24 hours after the last administration of BrdU in Pb-exposed rats. It should be noted however, that in the study of Gilbert et al., (2005) BrdU was given repeatedly during 12 days. Repeated daily administration of BrdU does not allow an exact estimation of proliferating cells, since, in the case of multiple BrdU injections over several days, cells are labeled over several cell cycles, and thus the total cell numbers will be influenced not only by the rate of proliferation but also by the differentiation and survival (Eisch, 2002). Our studies also show that not only proliferation of neuronal precursors was retarded, but Pb exposure also affected survival and maturation of the newly born cells into adult neurons. Indeed, our study shows that three weeks after BrdU administration fewer BrdU-positive cells survived in Pb-exposed rats. Furthermore, the maturation of BrdU-positive cells into adult calbindin-positive neurons is reduced, whereas the proportion of young post-mitotic neurons expressing Tuj1 is significantly higher in Pb-exposed rats than in control animals. On the basis of these data we propose that Pb

exposure retards transition of young postmitotic neurons into adult neurons. Our data also show that observed alterations in neurogenesis are accompanied by an enhanced gliogenesis since a higher proportion of astroglial cells were generated from BrdU-positive cells. Activation of astroglia and enhanced expression of astroglial protein GFAP, after Pb exposure, has also been described by others (Selvin-Testa et al., 1994; Struzinska et al., 2001). How the observed changes in the differentiation of newly generated cells, affecting hippocampal functions, remain largely unknown. All current evidence shows that generation of the new cells in the dentate gyrus might have an importance for the hippocampal functions when newly generated cells differentiate into mature neurons, establish synaptic contacts and become integrated into the hippocampal circuitry, thereby providing a greater degree of plasticity to the mature brain (Snyder, et al., 2001; Van Praag et al., 2002). The reduction in the number of mature granule neurons might result in the decreased level of the neuronal plasticity of the brain. On the other hand, the accumulation of immature, migrating neurons, in the dentate gyrus, might be also relevant since immature neurons provide an increased risk of inappropriate migration, establishment of aberrant synaptic contacts, formation of aberrant neural networks within hippocampal formation and thereby might affect hippocampal functions (Scharfman et al., 2002).

Until the present date it is impossible to establish a direct link between observed increase in anxiety and impaired contextual memory and alterations in neurogenesis seen in Pb-exposed rats. Only some indirect correlations could be provided to support a possible link between memory impairment and reduced neurogenesis observed in this study. Lesion studies show that CA3 CA1 and the dentate gyrus are critically involved in the acquisition and retrieval of contextual fear memories (Lee and Kesner, 2004). Animals with the mutation in presenilin 1 gene, responsible for the development of familial Alzheimer's disease, demonstrate deficits in contextual fear memory and reduced neurogenesis (Wang et al., 2004) similar to those observed in our experiments. When animals are grown in an enriched environment they learn better and demonstrate more hippocampal neurogenesis (Van Praag et al., 1999). At the same time, an enriched environment is also neuroprotective against lead-induced hippocampal memory deficits (Schneider et al., 2001). On the other hand, previous studies, when inhibition of neurogenesis was induced by the administration of antimitotic agent methylazoxymethanol, failed to affect contextual fear conditioning or spatial navigation learning in the morris water maze (Shors et al., 2002). Thus, the

direct link between contextual fear memory formation and hippocampal neurogenesis has not been established yet and further experiments are needed.

Taken together our data show that Pb exposure during the early postnatal period induces continuous inhibition of neurogenesis within the dentate gyrus, which might affect hippocampal functions and at least in part contribute to behavioral deficits in adulthood.

Acknowledgements: This current work was supported by Estonian Science Foundation grants 5326, and 6504. We also thank Mrs. Ulla Peterson and Dr. T.-L. Heidmets for their kind technical assistance.

5. References

Altman, J., 1962. Are new neurons formed in the brain of adult mammals? *Science*, 135, 1127-1128.

Bourljeily, N., Suszkiw, J.B., 1997. Developmental cholinotoxicity of lead: loss of septal cholinergic neurons and long-term changes in cholinergic innervation of the hippocampus in perinatally lead-exposed rats. *Brain Res.* 771, 319-328.

Cameron, H.A., Wooley, C.S., McEwen, B.S., Gould E., 1993. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of adult rat. *Neurosci.* 56, 337-344.

Canfield, R.L., Henderson, C.R., Cory-Slechta, D.A., Cox, C., Jusko, T.A., Lanphear, B.P., 2003. Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 µg per deciliter. *New Engl. J. Med.* 348, 1517-1526.

Eisch, A.J., 2002. Adult Neurogenesis: implications for psychiatry. *Progr. Brain Res.*, (M.A. Hofman, G.J. Boer, A.J.G.D. Holtmaat, E.J.W. van Someren, J.Verhagen and D.F. Swaab, Eds.). 138, 317-344.

- Finkelstein, Y., Markowitz, M.E., Rosen, J.F., 1998. Low-level lead-induced neurotoxicity in children: an update on central nervous system effects. *Brain Res. Rev.* 27, 168-176.
- Gilbert, M., Kelly, M., Samsam, T., Goodman, J., 2005. Chronic developmental lead exposure reduces neurogenesis in adult rat hippocampus but does not impair spatial learning. *Toxicol.Sci.*, Electronic publication ahead of print.
- Gundersen, H.J., Jensen, E.B., 1987. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J. Microscopy*, 147(3), 229-263.
- Hastings, N.B., Tanapat, P., Gould, E., 2001. Neurogenesis in the adult mammalian brain. *Clin.Neurosci.Res.* 1, 175-182.
- Huang, F., Schneider, J.S., 2004. Effects of lead exposure on proliferation and differentiation of neural stem cells derived from different regions of embryonic rat brain. *NeuroToxicol.* 25, 1001-1012.
- Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M., Woznjak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Stefovská, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J., 2000. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*, 287, 1056-1060.
- Jacobs, B.L., van Praag, H., Gage F.H., 2000. Adult hippocampal neurogenesis and psychiatry: novel theory of depression. *Mol. Psychiat.* 5, 262-269.
- Jaako, K., Zharkovsky, T., Kaasik, A., Zharkovsky, A., 2003. Ethanol intoxication reduces whereas ethanol withdrawal transiently enhances, production of the neural progenitor cells in the adult mouse dentate gyrus. *Neurosci. Res. Comm.* 33, 158-167.
- Kemperman, G. 2002. Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *J. Neurosci.* 22, 635-638.

- Lee, I., Kesner, R.P., 2004. Differential contribution of dorsal hippocampus subregions to memory acquisition and retrieval in contextual fear-conditioning. *Hippocampus*, 14, 301-310.
- Lemaitre, V., Koehl, M., Le Moal, M., Abrous, D.N., 2000. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *PNAS*, 97, 11032-11037.
- Moreira, E.G., Vassilieff, I., Vassilieff, V.S., 2001. Developmental lead exposure: behavioral alterations in the short and long term. *Neurotoxicol. Teratol.* 23, 489-495.
- Murphy, K.J., Regan, C.M., 1999. Low level lead exposure in the early postnatal period results in persisting neuroplastic deficits associated with memory consolidation. *J. Neurochem.* 72, 2099-2104.
- Roceri, M., Hendriks, W., Racagni, G., Ellenbrock, B.A., Riva, M.A., 2002. Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Mol. Psychiat.* 7, 609-616.
- Salinas, J.A., Huff, N.C., 2002. Lead and conditioned fear to contextual and discrete cues. *Neurotoxicol. Teratol.* 24, 541-550.
- Scharfman, H.E., Sollas, A.L., Goodman, J.H., 2002. Spontaneous recurrent seizures after pilocarpine-induced status epilepticus activate calbindin-immunoreactive hilar cells of the rat dentate gyrus. *Neurosci.* 111, 71-81.
- Schors, T.J., Townsend, D.A., Zhao, M., Kozorovitsky, Y., Gould, E., 2002. Neurogenesis relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus*, 12, 578-584.
- Schneider, J.S., Lee, M.H., Anderson, D.W., Lidsky, T.I., 2001. Enriched environment during development is protective against lead-induced neurotoxicity. *Brain Res.* 896, 48-55.

- Selvin-Testa, A, Loidl, C.F, Lopez-Costa, J.J, Lopez E.M, Pecci-Saavedra, J., 1994. Chronic lead exposure induces astrogliosis in hippocampus and cerebellum. *Neurotoxicol.* 15, 389-401.
- Snyder, J.S.; Kee, N., Wojtowicz, J.M., 2001. Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. *J. Neurophysiol.* 85, 2423-2431.
- Struzynska, L., Bubko, I., Walski, M., Rafalowska, U., 2001. Astroglial reaction during the early phase of acute lead toxicity in the adult rat brain. *Toxicol.* 165, 121-131.
- Toscano, C.D., McGlothan, J.L., Guilarte, T.R., 2003. Lead exposure alters cyclic-AMP response element binding protein phosphorylation and binding activity in the developing brain. *Devl. Brain Res.* 145:219-228.
- Toscano, C., Hamshemzadeh-Gargari, H., McClothan, J.L., Guilarte, T.R., 2002. Developmental Pb²⁺ exposure alters NMDAR subtypes and reduces CREB phosphorylation in the rat brain. *Devl. Brain Res.* 139, 217-226.
- Van Praag, H., Christie, B.R., Sejnovski, T.J., Gage, F.H., 1999 Running enhances neurogenesis, learning and long-term potentiation in mice. *PNAS*, 96, 13427-13431.
- Van Praag, H., Schinder, A.F., Christie, B.R. Toni, N., Palmer, T.D., Gage, F.H., 2002. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415, 1030-1034.
- Wang, R., Deineley, K.T., Sweatt, J.D., Zheng, H., 2004. Presenilin 1 familial Alzheimer's disease mutation leads to defective associative learning and impaired adult neurogenesis. *Neuroscience*, 126, 305-312.
- West, M.J., 1988. The new stereological tools: disector, fractinator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 96, 857-881.

West, M.J., Slomjanka, L., Gundersen, H.J.G., 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using optical fractinator. *Anat. Res.* 231, 482-491.

Xu, Y.-Z., Ruan, D.-Y., Wu, Y., Jiang, Y.-B., Chen, S.-Y., Chen, J., Shi, P., 1998. Nitric oxide affects LTP in area CA1 and CA3 of hippocampus in low-level lead-exposed rat. *Neurotoxicol. Teratol.*, 1998, 20, 69-73.

Zharkovsky, T., Kaasik, A., Jaako, K., Zharkovsky, A., 2003. Neurodegeneration and production of the new cells in the dentate gyrus of juvenile rat hippocampus after a single administration of ethanol. *Brain Res.* 978, 115-123.

Table 1.

Pb concentrations in blood and brain tissues of pups at various times during (15 and 30 days) and after (60 and 80 days) administration of Pb acetate with drinking water. The data are mean \pm SEM of 3-6 experiments at each time point. * p <0.01; ** p <0.001

	Postnatal days				
	15	30	60	80	Control
Blood (μ g/dl)	29.3 \pm 5.0**	34.2 \pm 5.8**	10.4 \pm 3.2	6.5 \pm 1.2	4.2 \pm 1.7
Brain (ng/g)	456 \pm 23**	781 \pm 87**	20 \pm 8*	6 \pm 1	6 \pm 2

Table 2.

The effect of the early postnatal Pb exposure on the differentiation of the newly born cells in the rat dentate gyrus. Rats were given i.p. marker BrdU in a total dose of 300 mg/kg and three weeks later BrdU-positive cells were examined for co-localization with neuronal or glial markers. The number of BrdU-positive cells examined per animal was 150-250. . The data are mean \pm SEM (n=6). * p <0.05; ** p <0.01 (Student's t-test).

Group	Number of BrdU-positive cells 3 weeks following BrdU administration	% co-localization with Tuj1	% co-localization with calbindin	% co-localization with GFAP
Control	2320 \pm 133	11.3 \pm 2.6	40.6 \pm 3.4	11.9 \pm 3.4
Pb-exposed	1562 \pm 256*	30.1 \pm 3.4**	28.7 \pm 3.5*	35.4 \pm 5.1*

Figure legends.

Figure 1. Locomotor activity of control and Pb-exposed rats measured as distance (cm) traveled (upper panel) and mean speed (cm/sec, lower panel) during a 30-min-observation period. N=8.

Figure 2. The effect of early Pb exposure on the behavior rats in the plus-maze test. Upper panel: The % of entries onto open arms; middle panel: The % of time spent on the open arms; Lower panel: The total number of entries. Values are mean±SEM from groups of 8 animals. * $p < 0.05$ (Student's t-test).

Figure 3. Contextual fear conditioning in control and Pb-exposed rats. Freezing time in seconds measured during 5 min. of the context presentation prior and 24, 48 and 72 hours following training. Values are mean±SEM from groups of 8 animals. ** $p < 0.01$ (Bonferroni test).

Figure 4. Production of the new cells in the rat dentate gyrus, following early postnatal Pb exposure. Light microscopic images of the BrdU-labeled cells in control (A) and Pb-exposed (B) rats. C: The number of BrdU-positive cells and D: The volume of dentate gyrus in control and Pb-exposed rats. N=6. * $p < 0.05$ (Student's t-test).

Figure 5. Confocal scanning laser images of sections double labeled by BrdU and marker for mature granule neuron calbindin (upper panel), marker for immature migrating neuron Tuj1 (middle panel) and marker for astroglia, GFAP (bottom panel). Arrows show cells demonstrating co-localization of BrdU marker with markers of neuronal and glial phenotypes. Scale bar: 50 μm

Figure 1

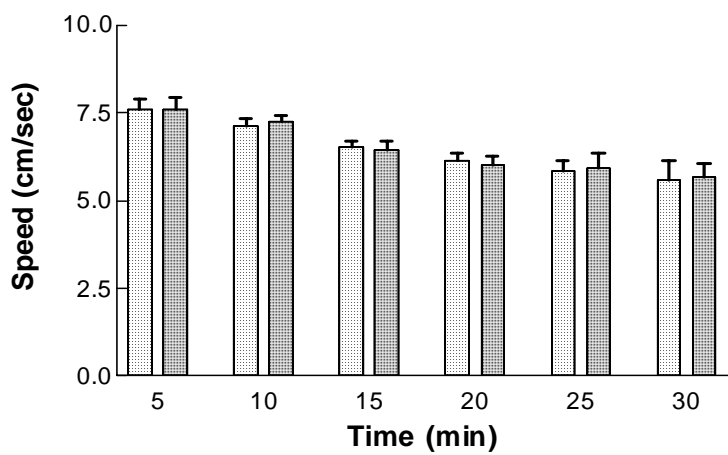
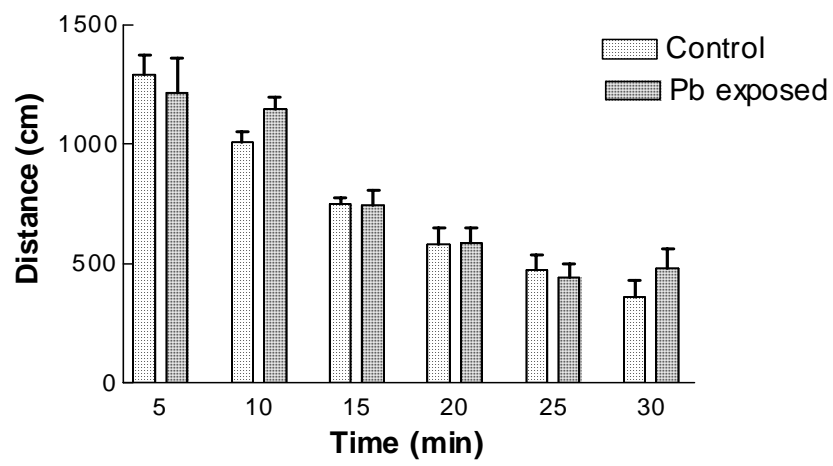


Figure 2

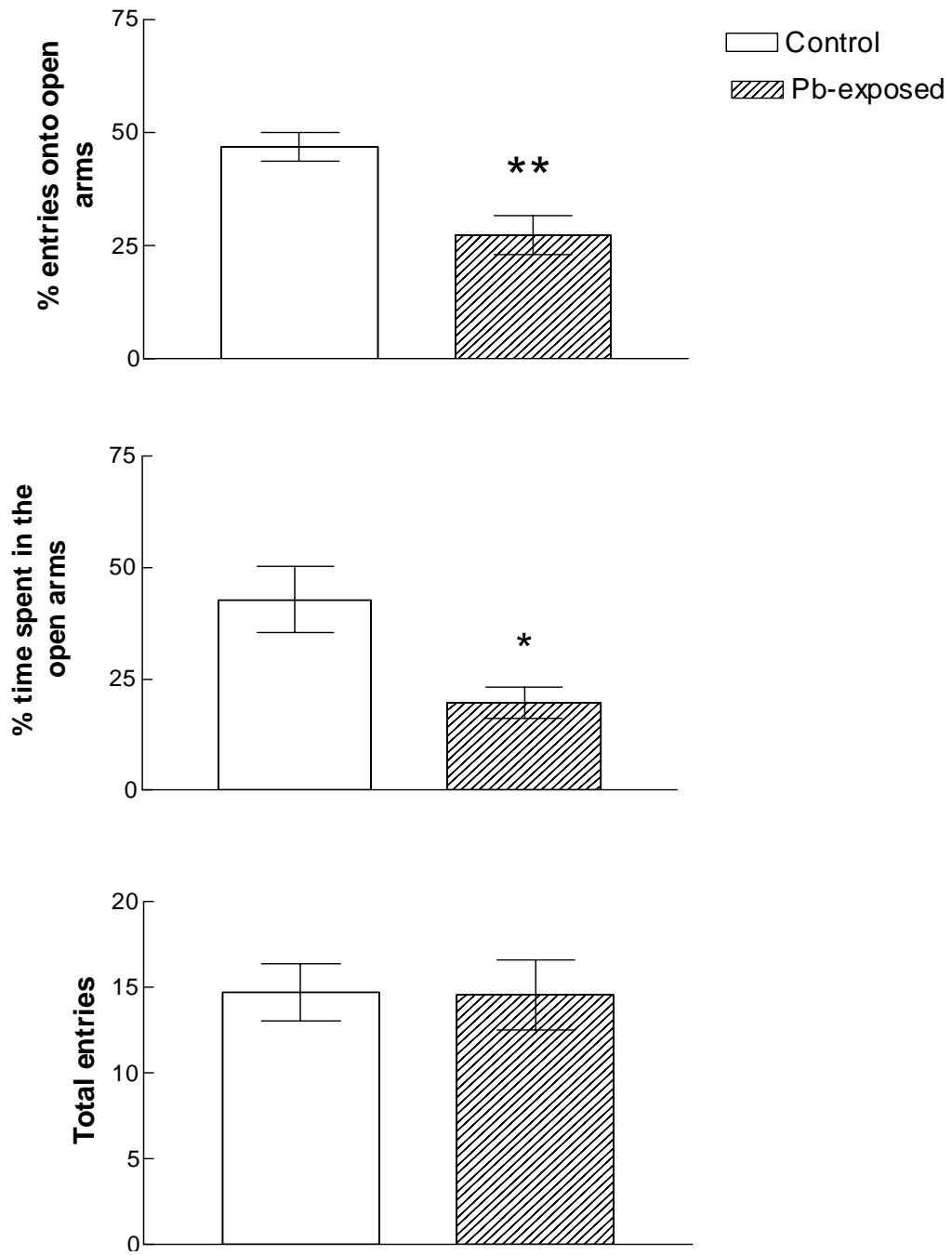


Figure 3

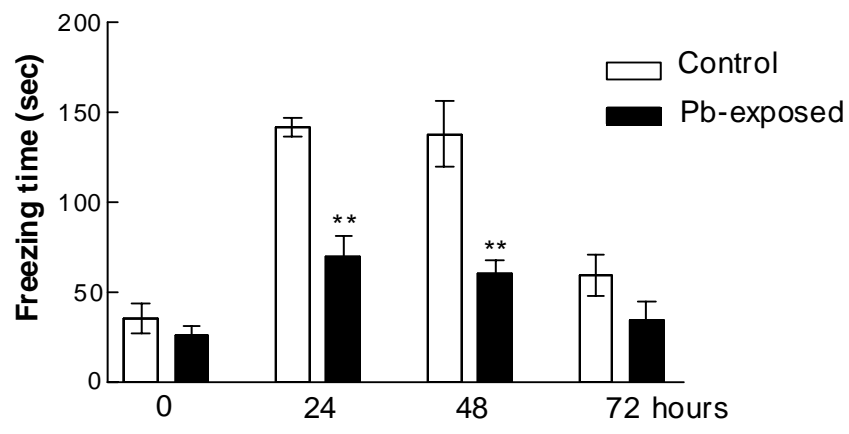


Figure 4

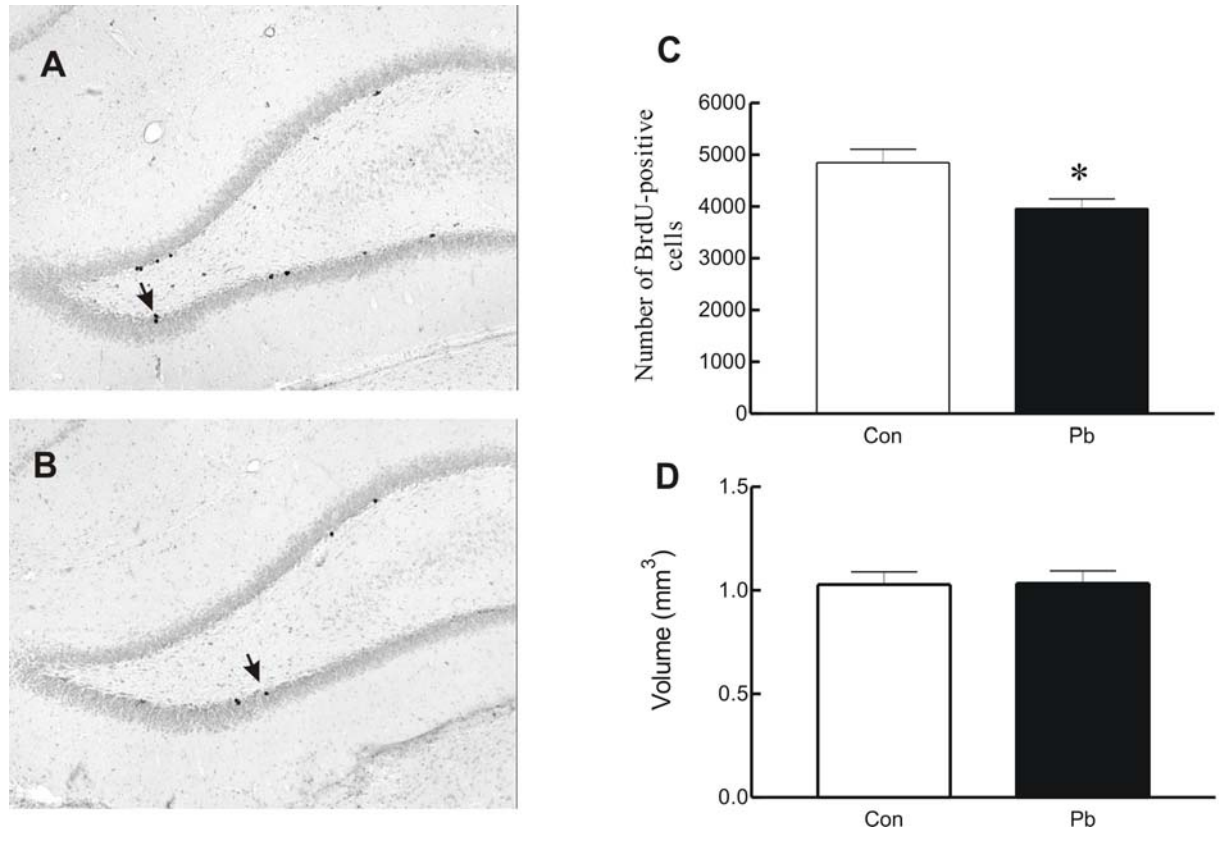
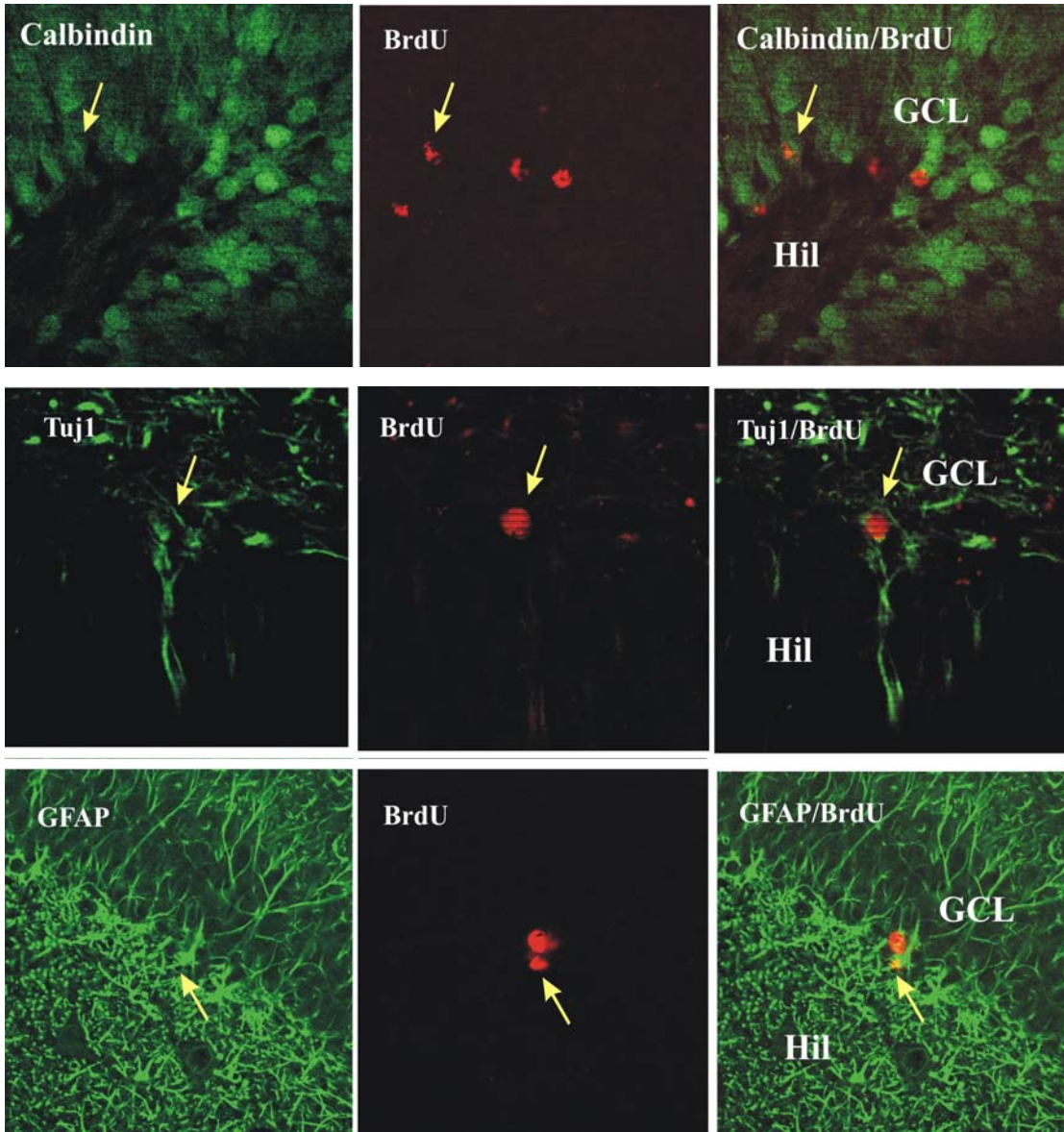


Figure 5



AUTORI ELULUGU

Monika Jürgenson

Sünniaeg ja koht: 8. veebruar 1972, Tartu

Kodakondsus: Eesti

2 last

e-mail: monika.jurgenson@ut.ee

Haridus

1990 – 1995 Tartu Ülikool, Füüsika-keemia teaduskond, keemia

1978 – 1990 Tartu 3. Keskkool

Teenistuskäik

02.2003 kuni tänaseni Tartu Ülikool, projektijuht

08. 1996 – 01. 2003 OÜ Medior Marketing, projektijuht

Erialane täiendõpe

15.06. – 19.06.2003 Toxicokinetic and Toxicodynamic Modelling in Occupational Health – Karolinska instituut, Rootsi

01.09.2003 – 23.01.2004 Human toxicology, ecotoxicology and risk assessment – toksikoloogia põhialused – Uppsala Ülikool, Rootsi

TARTU ÜLIKOOLI MAGISTRITÖÖD RAHVATERVISHOIOUS

1. **Diva Eensoo.** Kehalise aktiivsuse seosed vaimse tervise ja isiksuse omadustega. Tartu, 2000.
2. **Karin Lilienberg.** Antropomeetrilised näitajad ja nende seosed vereplasma lipiidide ning arteriaalse vererõhuga Tallinna kooliõpilaste uuringute alusel aastatel 1984–86 ja 1998–99. Tartu, 2002.
3. **Liis Merenäkk.** Koolilaste alkoholi ja narkootikumide tarbimise seos isiksuseomaduste ning vereliistakute monoamiinoksüdaasi aktiivsusega. Tartu, 2002.
4. **Anneli Zirkel.** Ravimite ja rahvameditsiini meetodite kasutamine Eesti elanike poolt. Tartu, 2002.
5. **Valentina Orav.** Tartu linna siseujulate tervisekaitseline olukord ja vee kvaliteet. Tartu, 2002.
6. **Katrin Kiisk.** Muutuste käsitus organisatsioonikultuuri, juhtide rolli, meeskonnatöö ja alternatiivide hindamise aspektist SA TÜK Kopsukliiniku asukoha muutuse näitel. Tartu, 2003.
7. **Mare Remm.** Helmintiaaside esinemine Tartu piirkonna lastepäevakodude lastel ja seda mõjutavad tegurid. Tartu, 2003.
8. **Liis Rooväli.** Haiglaravi kasutamine ja kättesaadavus Eestis: demograafilised erinevused ja kauguse mõju. Tartu, 2003.
9. **Krystiine Liiv.** Suitsetamise seotus isiksuseomadustega teismeliseas. Tartu, 2003.
10. **Svetlana Lissitsina.** B- ja C-viirushepatiitide haigestumuse epidemioloogiline uurimine Ida-Virumaal. Tartu, 2003.
11. **Tiiu Rudov.** Immuniseerimise järelevalves esinevad probleemid. Tartu, 2003.
12. **Natalja Zubina.** Solaariumiteenuse tervisekaitsealased aspektid. Tartu, 2003.
13. **Mihhail Muzotsin.** Fluoriidide sisaldus Pärnu alamvesikonna elanike joogivees, nende toksilisusest tulenevate terviseriskide analüüs ja võimalik juhtimine. Tartu, 2003.
14. **Mai Vaht.** Looduslik ultraviolettkiirgus Pärnu rannas ja selle mõju päevitajate lümfotsüütide alaklassidele. Tartu, 2004.
15. **Irina Filippova.** Patient dose survey in x-ray radiography. Tartu, 2004.
16. **Urve Eek.** Marutõve oht Eestis aastatel 1999-2003. Tartu, 2004.

17. **Natalia Kerbo.** Immunoprolaktika mõju punetiste epideemiaprotsessile Eestis. Tartu, 2004.
18. **Leena Albreht.** Viru-Peipsi alamvesikonna joogivee tervisekaitseline hinnang. Tartu, 2004.
19. **Marina Karro.** Tallinna välisõhu saastumuse võimalik mõju tervisele. Tartu, 2004.
20. **Sigrid Vorobjov.** Ravijärgimus juhuslikustatud hormoonasendusravi uuringus. Tartu, 2005.
21. **Oleg Novikov.** Kaitsevæeteenistuse mõju ajateenijate tervisele. Tartu, 2005.
22. **Eleri Lapsaniit.** Väikelaste infektsioonhaiguste ambulatoorne ravi antibiootikumidega. Tartu, 2005.
23. **Svetlana Rudenko.** Antibiootikumresistentsus Eestist isoleeritud haigustekitajatel. Tartu, 2005.
24. **Merike Sisask.** Suitsidaalsus ühiskonnas ning suitsiidikatse sotsiaaldemograafilised, meditsiinilised ja psüühilised mõjurid. Tartu, 2005.
25. **Kaire Vals.** Haiguskoormuse tõttu kaotatud eluaastad Eestis. Tartu, 2005.