

PER OS MN-EXPOZÍCIÓ MODELLÉZÉSE ÉS FUNKCIONÁLIS IDEGRENSZERI HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA PATKÁNYBAN

MÁTÉ ZSUZSANNA, SZABÓ ANDREA, OSZLÁNCZI GÁBOR,
PAPP ANDRÁS

SZTE Általános Orvostudományi Kar Népegészségtani Intézet, Szeged

Összefoglalás: A mangán (Mn) az ember számára nélkülözhetetlen nyomelem, ugyanakkor nagyobb mennyiségben a szervezetbe kerülve károsítja az idegrendszert. A hegesztés, bányászat, és a Mn-tartalmú növényvédők szerek jelentősek, mint foglalkozási expozíciós források. A lakosság benzin-adalékanyag (USA), továbbá szennyezett élelmiszer (Japán, Törökország) vagy ivóvíz (Görögország, Ausztrália) által exponálódhat. Tartós kitettség mellett a Mn kumulálódik a központi idegrendszerben, aminek következtében neurodegenerációra utaló tünetek alakulhatnak ki (manganizmus). A Parkinson-kórhoz hasonló, általában több éves expozíció után megjelenő tünetek kialakulásában a dopaminerg, GABAerg és kolinerg rendszer károsodása, valamint a mitokondriumok működésének zavara egyaránt szerepet játszik.

A Mn-expozíció idegrendszeri funkciókra gyakorolt funkcionális hatásának mielőbbi kimutatásához elektrofiziológiai módszereket alkalmaztunk. Korábbi kísérleteink alapján a patkány bajuszmezőjének kettős ingerlésével kiváltott szomatoszenzoros agykérgi potenciálok más mitokondriális toxinok (3-nitropropionsav, MK-801) hatásai esetében érzékeny paraméternek bizonyultak. Ebből kiindulva kísérleteinkben altatott patkány primer szomatoszenzoros kérgéről kiváltott potenciálokat vezettünk el kettős ingerléssel különböző interstimulus intervallumokkal. Az elektrofiziológiai regisztrálást megelőző kezelés 6 hétig tartott. Ez alatt az állatok 2,5 mg/ml koncentrációban, az itatóvízben oldva kapták a $MnCl_2$ -ot, majd a kezelési periódus végén állatonként 2 felvételt regisztráltunk. A kiváltott potenciálok latencia és amplitúdó értékeit vizsgáltuk, valamint kiszámítottuk a kettős kiváltott potenciálok megfelelő paramétereinek (második:első) arányát. Az elektrofiziológiai vizsgálatok után az állatok hasi aortájából vett vérből meghatároztuk a Mn koncentrációt.

A per os kezelés hatására a kontroll csoport adataihoz viszonyítva a kettős kiváltott potenciálok közül a második potenciál csúcstól-csúcsig mért amplitúdója szignifikáns csökkenést mutatott, melynek oka a pozitív csúcs amplitúdójának szintén szignifikáns mérséklődése volt. A latencia idők szignifikánsan lerövidültek az első potenciál megfelelő paramétereikhez képest (kisebb második:első arány). A kezelt állatok vérében a kontroll értékhez képest nem tapasztaltunk Mn-szint emelkedést. A Mn-intoxikáció monitorozása szempontjából tehát a szomatoszenzoros kiváltott potenciálok amplitúdó és latencia értékeinek vizsgálata alkalmasnak bizonyult.

Kulcsszavak: mangán-klorid, mitokondriális toxin, elektrofiziológia, kiváltott potenciál, patkány

Égésztudomány 55/1 71-81 (2011)
Közlésre érkezett: 2010 október 18-án
Elfogadva: 2010. november 3-án

MÁTÉ ZSUZSANNA
PhD hallgató
6720 Szeged, Dóm tér 10.
Tel.: + 62-545-119
Fax: + 62-545-120
e-mail: matezs@puhe.szote.u-szeged.hu

Bevezetés

A Mn a szervezet számára szükséges nyomelem: a napi ajánlott bevitel kb. 5 mg (1). Főként ételekből fedezhetjük ezt a mennyiséget: a zöldségek (pl. hüvelyesek), a teljes kiőrlésű gabona és különböző teafélék tartalmaznak nagyobb mennyiségű Mn-t. Számos enzim komponense, ilyen pl. a szuperoxid-dizmutáz (Mn-SOD), mely az oxidatív stressz elleni védekezésben játszik fontos szerepet. A glutamin-szintetáz, az alkalikus foszfatáz, az argináz és a piruvát-karboxiláz is tartalmaz Mn-t; számos további oxidoreduktáz, transzferáz, hidroláz, liáz, izomeráz és ligáz szintén Mn függő módon működik (2).

Jelenléte a szervezetben szükséges a normális csontképzéshez és a mukopoliszacharidok képződéséhez, az aminosav-, lipid-, fehérje- és szénhidrát- metabolizmushoz, az immunrendszer normál funkciójához, a sejt energiaszintjének fenntartásához (ATP-vel és szerves foszfáttal alkotott komplexekben), s szerepet játszik a vércukorszint szabályozásában is (3). A K-vitaminnal együtt elősegíti a véralvadást. Hiányának kóros következményeit embereknél nem tapasztalták, de állatokban reprodukciós zavarokat, intrauterin és neonatális mortalitást, vázrendszeri abnormalitásokat és agykárosodást írtak le.

A Mn több módon kerülhet be a szervezetbe. Foglalkozási expozícióként általában a beléggzéssel, lakossági esetén pedig az étellel vagy vízzel való bejutás a leggyakoribb. Utóbbinál a Mn a gyomor-bél rendszeren keresztül szívódik fel; egy része így azonnal bejut a véráramba, másik része viszont deponálódik a májban. A felszívódott Mn^{2+} oxidálódik, és Mn^{3+} -má alakul, amely az agy kapilláris endothél sejtjeinek felszínén található transzferrin receptorokhoz kötődik. (A Mn leggyakrabban Mn^{+2} , Mn^{+3} és Mn^{+7} oxidációs állapotban fordul elő, melyek a biokémiai funkcióiban is szerepet játszanak.)

A vér-agy gáton így receptor-mediált endocitózissal, más esetben pedig feszültség függő vagy glutamát-aktiválta ioncsatornákon keresztül jut át, melyek eredetileg Ca^{2+} -ot szállítanak a sejt belseje felé. Fiziológiásan a globus pallidus, a striatum és a hipotalamus tartalmazza a legtöbb mangánt. A sejten belüli eloszlást tekintve a mitokondriumoknak a legnagyobb a Mn-tartalma. Krónikus expozíció hatására is a mitokondriumokban kumulálódik a legtöbb Mn, mivel ez a sejtalkotó tartalmazza a Mn-SOD enzimet. Ezen kívül az asztrociták Mn tartalma jelentős, mert egy szintén Mn-függő enzim, a glutamin-szintetáz, található nagy mennyiségben ezen sejtek citoplazmájában (4).

A vulkanikus tevékenység során felszabaduló por megnöveli a légkör Mn tartalmát. A környezeti Mn szennyezés tekintetében azonban az ipari expozíciós forrás a meghatározó: a kohászatból, valamint a mára már csak kevés helyen alkalmazott, Mn-t tartalmazó MMT (metilciklopentadienil-Mn-trikarbonil) benzín adalék elégéséből származik a szennyeződés többsége. A Mn a hegesztőpálcák alkotórésze, és számos fémötvözet, pl. az ötvözött acélok elengedhetetlen alkotóeleme. A szárazelemek gyártása, az üvegek, kerámiák és festékek készítése során is használnak Mn-t.

Új felhasználási terület a mágneses rezonancián alapuló diagnosztikai képalkotásban való hasznosítása, melyben a mangafodipir-trisodiumot (Mn-DPDP, Teslascan) kontrasztanyagként alkalmazzák. A mezőgazdaságban is használnak mangán tartalmú gombaölőket (Maneb, Mancozeb), melyek a természetes vizek Mn szennyezésének fő forrásai (5).

Előfordultak olyan esetek, amikor a lakosság az ivóvíz magas mangán tartalma miatt exponálódott; az ott élők körmében, hajában, illetve agyában is megnövekedett a Mn-szint, s ez egyes esetekben neurológiai következményekkel is járt. Japánban egy olyan település vize szennyeződött Mn-nal, melynek közelében a földbe temették a szárazelemeket (6), míg Kínában a szennyvíz által Mn-nal szennyezett ivóvíz hozott létre gyermekekben neurológiai elváltozásokat. Görögországban a természetes eredetű magas Mn tartalmú ivóvizet

fogyasztók idegrendszeri károsodásait írták le (7). Banglades és Kambodzsa területén szintén gyermekeknél fedeztek fel szellemi károsodást azokban a tartományokban, ahol az ivóvíz Mn koncentrációja meghaladta a határértéket (8, 9). Egy, az Egyesült Államokban készült esettanulmány szerint a Mn hatására az exponáltak vizuális és verbális memóriája károsodott, amely a Mn egyik ismert toxikus hatása (10). A mangánmérgezés kimutatására expozíciós biomarkerként a Mn vérből, vizeletből és hajból történő meghatározását használják.

Karcinogenitását illetően az International Agency for Research on Cancer (IARC) a Mn tartalmú gombaölő szert, a Manebet 3. kategóriás szereknek nyilvánította (azaz emberben rákkeltő hatását nem bizonyították, de nem is zárták ki); állatkísérletekben eddig nem észleltek rákkeltő hatást. Meg kell azonban jegyezni, hogy a relatíve magas Mn dózis befolyásolja a DNS replikációt és a repair mechanizmusokat. A legtöbb Mn só átjut a placentán, így teratogén hatással rendelkezik (11), melyet egy Ausztráliában készített tanulmány is bizonyított (12).

Saját kísérletekben egy olyan paramétert – hatás-biomarkert – kerestünk, mely kellően érzékeny a Mn idegrendszeri hatásaira. A kiindulási alap az Intézetünkben kidolgozott, kettős ingerlésen alapuló kísérleti protokoll volt, mely korábbi munkáinkban alkalmasnak bizonyult mitokondriális toxinok funkcionális idegrendszeri hatásának követésére (13). Feltételeztük, hogy a Mn ivóvízben való bejuttatása, – kombinálva a szomatoszenzoros kettős ingerléssel – alkalmasabb lehet a mangánmérgezés korai, a motoros tünetek megjelenése előtti kimutatására, mint a vér Mn koncentrációjának meghatározása, mivel azt a táplálkozással bevitt Mn nagymértékben befolyásolja (8).

Anyagok és módszerek

A kísérleteket felnőtt hím Wistar patkányokon végeztük, melyek testtömege a kísérletek kezdetén 200 ± 10 g volt. Az állatokat standard állatházi körülmények között tartottuk ($22\text{--}24$ °C, 12 órás fény/sötét ciklus; kezelt csoport: 1 állat/ketrec; kontroll csoport: 4 állat/ketrec). A kezeléshez használt MnCl_2 a Sigma-Aldrich Kft.-től, az altatáshoz használt uretán a Reanal Kft.-től származott.

A per os kezelés során az állatok spontán ivóvíz fogyasztását mértük. Mililiterenként 2,5 mg MnCl_2 -ot oldottunk fel csapvízben, melyet a kezelt csoportba tartozó 12 állat 6 hétig ivott, míg a kontrollként használt 8 állat ez idő alatt tiszta csapvizet fogyasztott. Mivel az itatáshoz felhasznált csapvíz Mn tartalma elhanyagolható (0,03 mg/l) volt (14), ezért azt a kumulatív dózis kiszámításánál figyelmen kívül hagyhattuk. A szakirodalomban talált adatok alapján az alkalmazott 2,5 mg/ml kis, ugyanakkor reális dózissnak számít (4, 15), ha a környezeti eredetű Mn intoxikáció lehetőségeit vesszük figyelembe.

A bevitt Mn mennyiség és a testtömeg közötti összefüggéssel kapcsolatban: nem a testtömeg kg-ra számított Mn bevitelt adtuk meg, hanem az átlagos Mn bevitelt. Ennek oka, hogy egy valós populációs expozíciót modellezve, és a beviteli módból adódóan az ivóvíz Mn-koncentrációja konstans volt, és nem az volt a célunk, hogy a testtömeg kg-ra jutó napi Mn bevitelt határozzuk meg. Hogy megelőzzük a Mn kiválását a csapvízből, az oldathoz citromsavat adtunk 0,25 mg/ml koncentrációban, mely nem befolyásolta az állatok ízérzékelését. Az oldat pH-ja 6,7 volt. A kezelés időtartama alatt naponta mértük a patkányok testtömegét és az ivóvíz fogyását, melyből a testtömeg-kilogrammmra jutó felvett Mn mennyiséget ki tudtuk számolni.

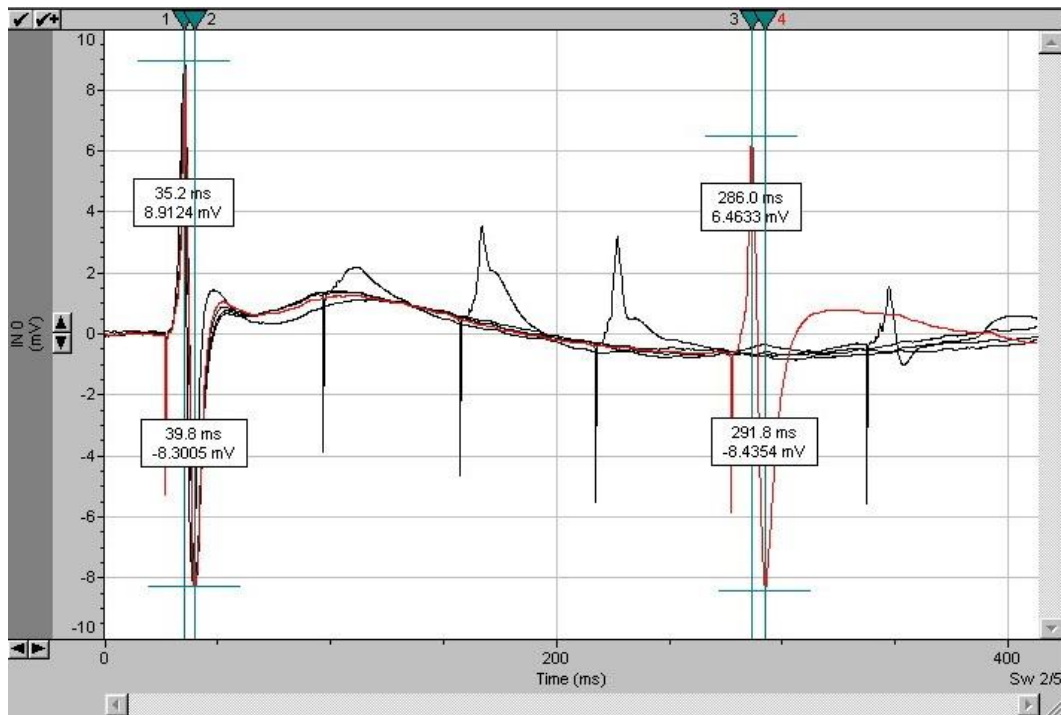
A hat-hetes kezelési periódus végén elektrofiziológiai vizsgálatot végeztünk. Az állatok ehhez szükséges preparálását uretános (1000 mg/ttkg) altatásban végeztük (16). Az anesztézia hatékonyságát a hátsó láb elhárító reflexével ellenőriztük. Az állat fejét sztereotaxiás vázba rögzítettük, majd eltávolítottuk a koponyatetőt borító bőr-, izom- és kötőszöveti rétegeket. A

helyi érzéstelenítéshez 10%-os lidocaint használtunk. Fogászati fűrő segítségével, a bal falcsonatot szegélyező varratok mentén trapéz alakú ablakot nyitottunk a koponyán, ügyelve arra, hogy a dura matert ne sértsük meg. A felületre vazelint kentünk, hogy megóvjuk a kiszáradástól a regisztrálást megelőző 30 perces pihentetés alatt. Ezt követően a patkányt egy másik, a regisztráló rendszerhez tartozó sztereotaxiás készülékbe helyeztük, majd a jobb oldali bajuszpárnába két ingerlő tüelektrodát szúrunk. Az elvezetéshez a feltárt primer szomatoszenzoros kéreg (pontosabban a barrelkéreg) felületére helyezett gömbvégű ezüst elektrodát használtunk, a pozícionáláshoz megkerestük azt a pontot, ahonnan a legnagyobb amplitúdójú jeleket tudtuk elvezetni (punctum maximum: általában a bregmától laterálisan 3-6 mm-re és poszterior 1-2 mm-re). A preparált területet szegélyező koponyabőrre krokodilcsipeszt csíptettünk, így biztosítottuk az elvezetéshez szükséges semleges pontot.

A szomatoszenzoros kiváltott potenciálok generálásához a CLAMPEX 8.0 (Axon Instruments Inc.) regisztráló-értékelő szoftvert használtuk. A bajuszmezőbe szúrt ingerlő elektrodapáron keresztül történő ingerlés 5 db, közvetlenül egymás után alkalmazott kettős inger sorozatából állt úgy, hogy a második stimulus az elsőt egyre rövidülő intervallumokkal követte [interstimulus intervallum (ISI) = 300, 240, 180, 120 és 60 ms]. Az 5 db kettős inger (5 „sweep”) alkotott egy sorozatot („run”), mely sorozatok 20 másodpercenként ismétlődtek, egy felvétel alatt összesen 20-szor. Egy felvétel így kb. 6 perc alatt készült el. 20 percenként indítottuk el a felvételi ciklusokat, így két felvétel közt a fennmaradó kb. 14 percben az állatnak elegendő ideje maradt a regenerálódásra. Ezt a protokollt, mely kellően informatívnak bizonyult, korábbi kísérleteink alkalmával alakítottuk ki.

A regisztrálást követően az állatokat uretánnal kíméletesen túlaltattuk, majd felboncoltuk. Általános toxikológiai paraméterként megmértük az agy, a thymus, a szív, a tüdő, a máj, a lép, a vesék és a mellékvesék tömegét, valamint vért vettünk a hasi aortából. A teljes vérből salétromsavas emésztést követően ICP-MS készülék segítségével Mn koncentráció (ppb) meghatározás történt.

Az elektrofiziológiai eredményeket szintén a CLAMPEX 8.0 szoftver segítségével értékeltük. A kiváltott potenciálok meghatározott, a jelen kísérlet szempontjából informatív paramétereit vizsgáltuk, azaz a csúcstól-csúcsig mért amplitúdót, valamint a pozitív és negatív csúcsok latenciaidejét (1. ábra). A szoftver a regisztrátumokat automatikusan átlagolta: a rögzített 20 run-ból kaptuk meg egy felvétel átlagát minden kettős ingerlésre. Az első és második inger által kiváltott kérgi potenciálok negatív és pozitív csúcsára manuálisan illesztettük a mérőkurzorokat, melyek az amplitúdó- és latencia-értékeket mérték. A mért adatokat excel táblázatba illesztettük, melynek segítségével kiszámítottuk a csúcsok közötti amplitúdó különbséget (csúcstól-csúcsig mért amplitúdó).



1. ábra: A CLAMPEX 8.0 regisztráló és értékelő szoftver által a szomatoszenzoros kettős ingerléssel kiváltott potenciálokról rögzített felvétel. A képen az amplitúdó és latencia értéket mutató mérőkurzorok is láthatóak.

Fig. 1. Somatosensory evoked potentials induced by double-pulse stimulation, recorded and averaged by the CLAMPEX 8.0 software. Cursors measuring amplitude and latency are also shown.

Az adatokból megadtuk a kettős kiváltott potenciálok megfelelő paramétereinek arányát (második:első arány). Ez az arány, mely az idegsejtek fáradási jelenségeit fejezheti ki, újszerű és informatív paraméternek bizonyult mitokondriális toxinokkal végzett vizsgálatainkban (13).

A statisztikai analízist Statistica for Windows 4.1 programcsomag felhasználásával, kétmintás t-próbával végeztük, a szignifikanciát $p < 0,05$ esetben fogadtuk el.

A kísérletek valamennyi fázisában betartottuk az Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága által megkövetelt előírásokat.

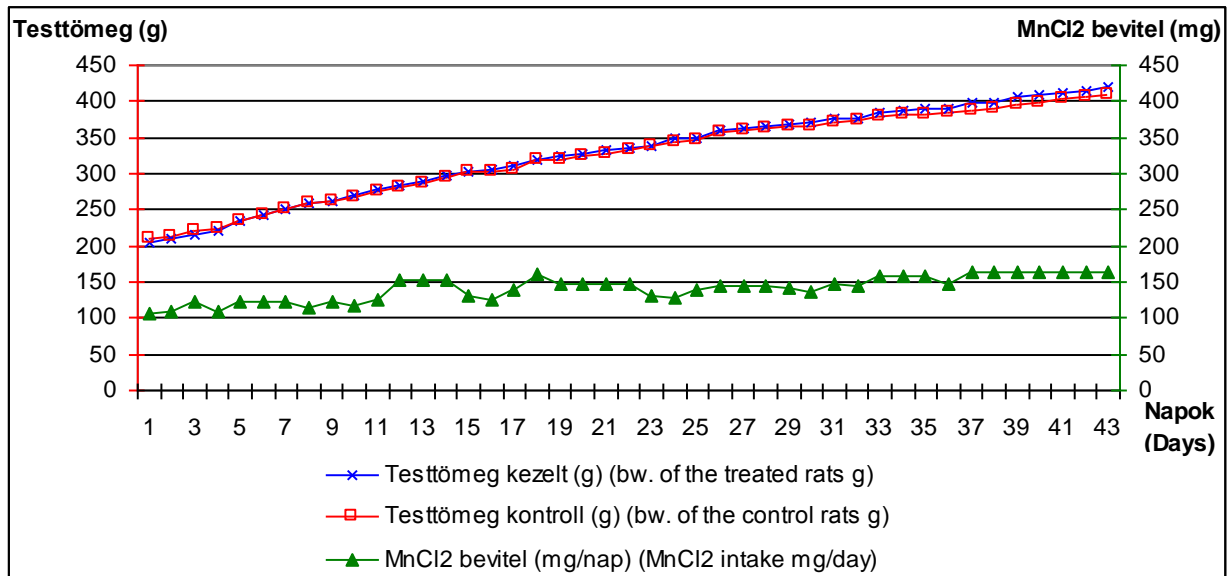
Eredmények

A hat-hetes adagolás során folyamatosan mértük a kezelt állatok ivóvíz-fogyasztását. A kontroll csoportba tartozók esetében erre nem volt szükség, mivel az elfogyasztott mennyiségnek a Mn expozíció szempontjából volt jelentősége. Az egyes állatok átlagos napi folyadék fogyasztása 56 ml volt, mellyel napi szinten egyenként átlagosan ~ 141 mg $MnCl_2$ -ot vettek fel. Ez a 6. hét végére patkányonként átlagosan 2682,2 mg per os Mn expozíciót jelentett (kumulatív dózis).

Az állatok testtömege a kísérlet ideje alatt folyamatosan és egyenletesen nőtt (2. ábra), tehát a szervezetükbe került Mn mennyiség nem befolyásolta a testtömeg-növekedést.

A csúcstól-csúcsig mért amplitúdó értékekben a 60 és 180 ms-os ISI-mal kiváltott válasznál találtunk szignifikáns csökkenést a kontroll csoporthoz képest, de csak a második kiváltott potenciál esetében (3. ábra). Külön-külön vizsgálva a pozitív és negatív csúcsok nullától számított amplitúdó értékeit, azt észleltük, hogy a kapott amplitúdó csökkenést csak a

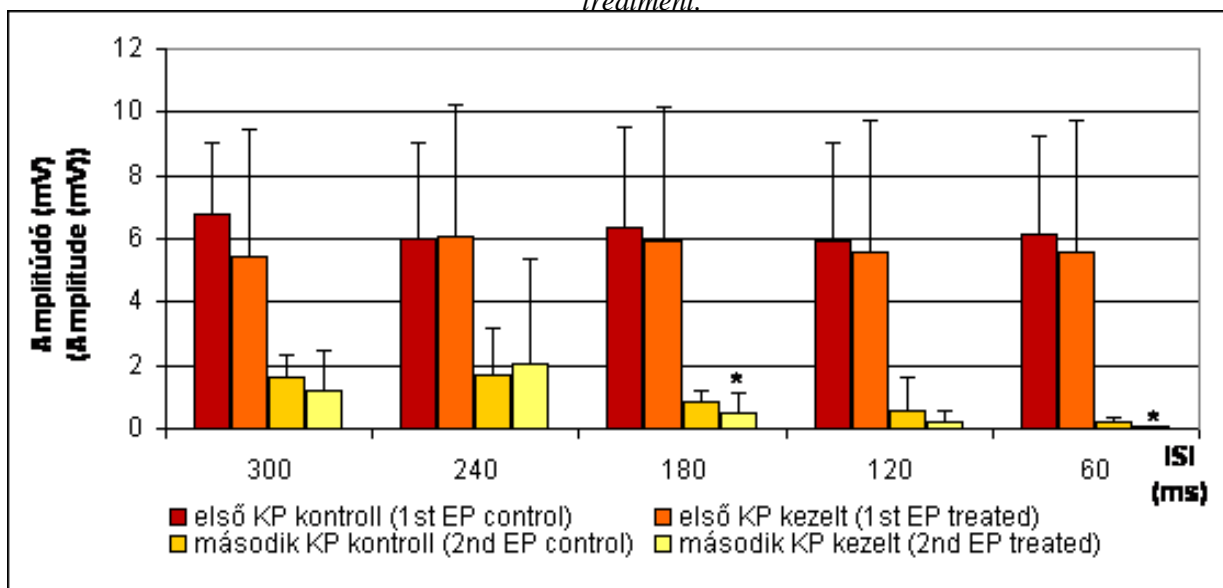
pozitív csúcs amplitúdójának csökkenése okozza (4. ábra). A negatív csúcsok amplitúdó értékei a kezelt csoportban nem tértek el jelentősen a kontroll értékektől (5. ábra).



2. ábra: A kezelt állatok testtömeg növekedése és átlagos napi $MnCl_2$ bevitel a 6 hetes kezelés során. Ordináta: az állatok testtömege (g) és a napi átlagos $MnCl_2$ bevitel (mg/nap); Abszcissa: kezelési napok száma.

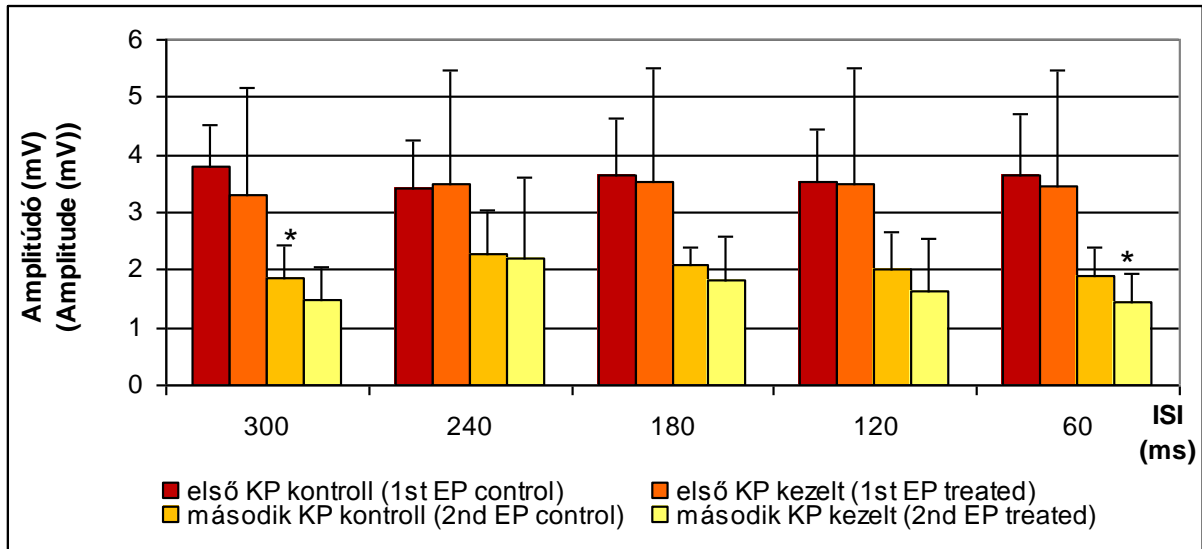
Fig. 2 Body weight (bw.) gain and daily $MnCl_2$ intake of the rats during the 6 week treatment period.

Ordinate: body weight of the rats (g) and daily $MnCl_2$ intake (mg/d/rat); Abscissa: days of treatment.



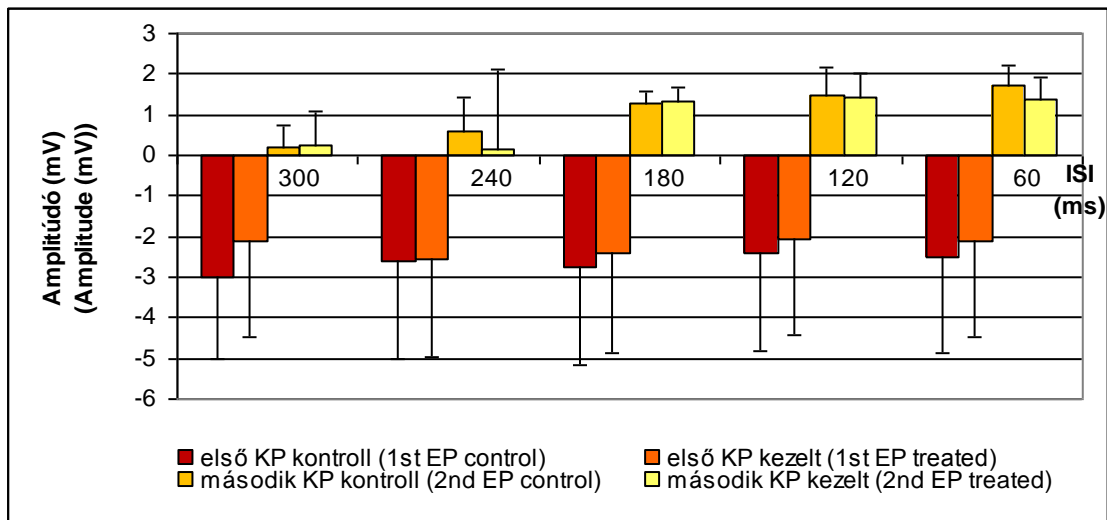
3. ábra: Az első és második kiváltott potenciálok csúcstól-csúcsig mért amplitúdó értékei a kontroll és a kezelt csoportban (átlag \pm SD). Ordináta: amplitúdó; Abszcissa: interstimulus intervallumok. * $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz viszonyítva

Fig. 3 Peak to peak amplitudes of the first and second evoked potentials (EPs) in control and treated groups (mean \pm SD). Ordinate: amplitude; Abscissa: interstimulus intervals. * $p < 0.05$ compared to control.



4. ábra: Az első és második kiváltott potenciálok pozitív csúcs amplitúdó értékei a kontroll és a kezelt csoportban (átlag±SD). Ordináta: amplitúdó; Abszcissa: interstimulus intervallumok. * $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz viszonyítva

Fig. 4 Positive peak amplitudes of the first and second evoked potentials (EPs) in control and treated groups (mean±SD). Ordinate: amplitude; Abscissa: interstimulus intervals. * $p < 0.05$ compared to control.

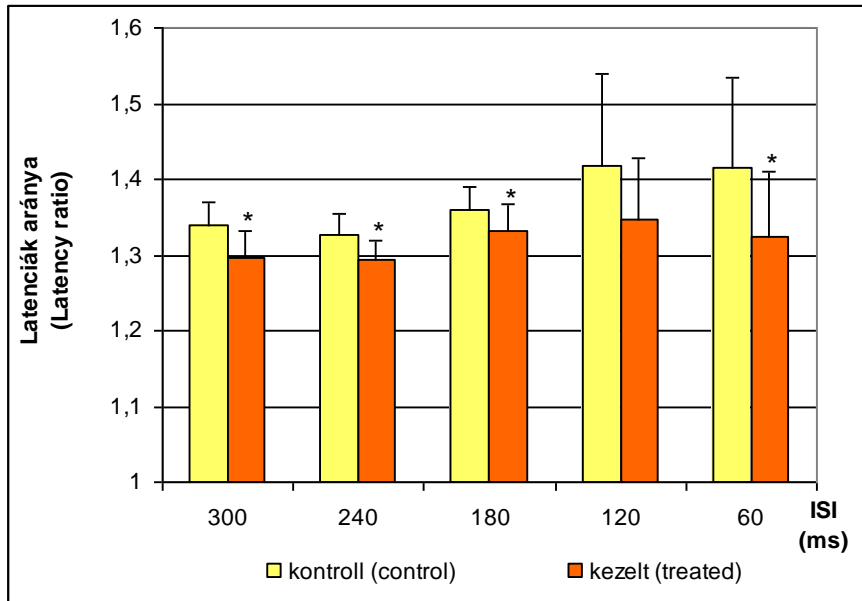


5. ábra: Az első és második kiváltott potenciálok negatív csúcs amplitúdó értékei a kontroll és a kezelt csoportban (átlag±SD). Ordináta: amplitúdó; Abszcissa: interstimulus intervallumok. * $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz viszonyítva

Fig. 5 Negative peak amplitudes of the first and second evoked potentials (EPs) in control and treated groups (mean±SD). Ordinate: amplitude; Abscissa: interstimulus intervals. * $p < 0.05$ compared to control.

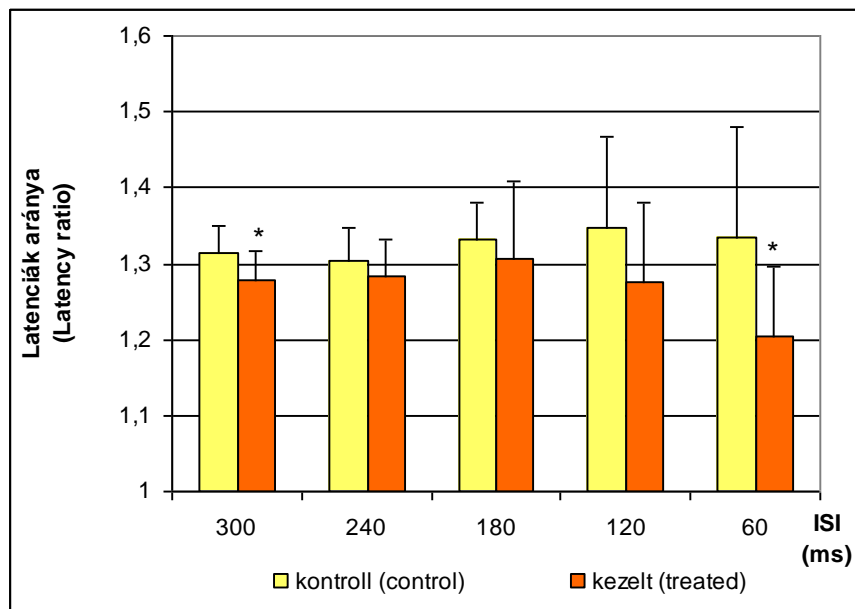
A latencia-értékek a kezelt és kontroll csoport esetében nem mutattak jelentős eltérést. A mangán hatására a paraméterek második:első arányai jellemzően az alacsonyabb értékek felé tolódtak el. A csúcstól-csúcsig mért amplitúdó második:első aránya – bár nem szignifikáns módon – minden ISI esetében a kontroll értékénél kisebb volt. A pozitív csúcsok latencia-értékeiből számított második:első arány a kezelt csoport esetében a kontrollban számíthatóhoz képest szignifikánsan alacsonyabb volt szinte minden ISI-nál, kivéve a 120 ms-ot (6. ábra). A

negatív csúcs esetében is jelentős csökkenést tapasztaltunk, bár az csak a 300 és 60 ms-os ISI esetében érte el a szignifikancia szintjét (7. ábra). A második:első arány csökkenése azt jelzi, hogy a kettős kiváltott potenciálok közül a második potenciál vizsgált paramétereinek értékei lecsökkentek a kontroll csoport ugyanezen mutatóihoz képest.



6. ábra: A kiváltott potenciálok pozitív csúcs latenciájának második:első aránya a kontroll és a kezelt csoportban (átlag±SD). Ordináta: a latenciák aránya; Abszcissa: interstimulus intervallumok. * $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz viszonyítva

Fig. 6 Second: first ratio of positive peak latencies of the evoked potentials (EPs) in control and treated groups (mean±SD). Ordinate: ratio of the latencies; Abscissa: interstimulus intervals. * $p < 0.05$ compared to control



7. ábra: A kiváltott potenciálok negatív csúcs latenciájának második:első aránya a kontroll és a kezelt csoportban (átlag±SD). Ordináta: a latenciák aránya; Abszcissa: interstimulus intervallumok. * $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz viszonyítva

Fig. 7 Second: first ratio of negative peak latencies of the evoked potentials (EPs) in control and treated groups (mean±SD). Ordinate: ratio of the latencies; Abscissa: interstimulus intervals. * $p < 0.05$ compared to control

A kezelt állatok szervtömegei nem változtak meg jelentősen a Mn kezelés hatására. Megállapítható, hogy a vizsgált szervek átlagos tömege a kezelt csoport esetében meghaladta a kontroll csoport értékeit, de az eltérés a szignifikancia szintjét többnyire nem érte el. Az egyetlen szignifikáns eltérést az agy esetében mértük, melynek tömege a kezelés hatására jelentősen csökkent. A vérből meghatározott Mn koncentráció a kezelt és kontroll csoport esetén semmilyen eltérést nem mutatott (kontroll: $222,27 \pm 49,37$ ppb; kezelt: $222,12 \pm 41,2$ ppb).

Megbeszélés

A környezeti Mn szennyezés hatását eddig többnyire intraperitoneális beadás alkalmazásával tanulmányozták, az irodalomban fellelhető legtöbb adat ilyen kísérletekből származik. Mi azonban fontosnak tartottuk a Mn per os bevitelének és az így okozott hatásának vizsgálatát, mivel ilyen eredetű intoxikáció ténylegesen előfordulhat. A bevitel módja és a fém oxidációs állapota meghatározza a transzport módját és a központi idegrendszer felé való sebességét. Az emésztőrendszerből felszívódott Mn^{2+} a sokkal toxikusabb Mn^{3+} -á alakul át, amely transferrinhez kötődve elszállítódik az agyba. A Mn a vérben csak rövid ideig tartózkodik, gyorsan eljut a célszervekbe (abszorpciós $t_{1/2} < 2$ óra).

Eredményeink szerint, annak ellenére, hogy a gasztrointesztinális traktusból történő abszolút biohasznosulás alacsony – mindössze 10-15% (17, 18) – a szubkrónikus expozíció jelentős változásokat hozott létre a vizsgált paraméterekben; az alkalmazott per os Mn kezelés a perifériás kettős ingerlés által egyértelműen kimutatható változásokat eredményezett a kérgi kiváltott potenciálokban.

A kettős ingerléssel végzett vizsgálatok ismert eljárásnak számítanak az elektrofiziológia területén (pl. paired pulse inhibition). Az in vivo kiváltott kettős potenciálok, és azok második:első értékeinek elemzése viszont nem gyakori. Centonze és munkatársai (19) intracelluláris elvezetéssel végeztek hasonló számításokat agyszeleteken, kettős ingerléssel kiváltott potenciálok értékelésekor; a Mn-nal krónikusan kezelt és kontroll állatok striatális sejtjeiben kiváltott posztzinaptikus potenciálokat és azok második:első arányát vizsgálták. Bár nyilvánvalóan nem vonható párhuzam az intracelluláris elvezetések és a kérgi kiváltott potenciálok eredményei között, a háttérben álló mechanizmusok mindkét esetben magyarázatul szolgálhatnak. Az említett kutatócsoport hozzánk hasonlóan arra a következtetésre jutott, hogy a glutamát visszavételi mechanizmusának romlása a posztzinaptikus kiváltott potenciálok második:első arányának csökkenéséhez vezet, azáltal, hogy a posztzinaptikus glutamát receptorok deszenzitizálódnak a szinaptikus résben maradt glutamát miatt (1).

A per os kezelés hatására a kettős kiváltott potenciálok közül a második válaszok csúcstól-csúcsig mért amplitúdói lecsökkentek. A csúcstól-csúcsig mért amplitúdók második:első aránya egységesen a kontroll értékek alatt maradt, bár szignifikancia nélkül. Bár a relatív latencia-értékek esetében nem találtunk érdemleges változást, ugyanezen paraméter második:első arányának elemzése felszínre hozta a különbségeket – mind a pozitív, mind a negatív csúcsokhoz tartozó latenciáidők szignifikánsan lerövidültek. A kiváltott válaszok tehát egyértelműen gyorsabban kialakultak, de kisebb amplitúdó értékeket vettek fel.

Az, hogy a vér mangán szintje nem változott meg jelentősen a kezelés hatására, egyértelműen alátámasztja, hogy a vér csak mint transzporter közeg játszik szerepet, és rövid idő alatt elszállítja a Mn-t a célszervekhez. A teljes vér Mn-koncentrációja nem precíz biomarkere a Mn-expozíciónak, de jobb, mint a plazma Mn-koncentráció meghatározás, a gyors Mn plazma clearance miatt. Annak alapján, hogy a kezelés hatására elektrofiziológiai vizsgálatokkal jól kimutatható neurológiai elváltozás jött létre, bizonyítottan tekinthető, hogy a Mn bejutott a központi idegrendszerbe. Ennek értelmében a Mn expozícióval összefüggő

változások korai kimutatására a vérből történő rutin fémszint meghatározás mellett célszerű az idegrendszeri elváltozások monitorozására is hangsúlyt fektetni.

Az Intézetünkben használt, szomatoszenzoros kettős ingerléssel kapcsolatos módszer, amely egyes mitokondriális toxinok esetében már bizonyította alkalmazhatóságát a károsodott idegrendszeri funkciók kimutatására, jelen eredményeink szerint a Mn esetében is felhasználhatónak mutatkozott. A szomatoszenzoros kettős ingerléssel az excitációs folyamatok dinamikus kölcsönhatása is jól tanulmányozható. A módszer finomításával és az ingerlési paraméterek változtatásával létrehozhatónak tartunk egy olyan modellt – neurofiziológiai hatás-biomarkert – melynek humán alkalmazásával komplex képet kaphatnánk az idegrendszer funkcionális állapotáról.

IRODALOM

1. *Aschner M., Lukey B., Tremblay A.*: The Manganese Health Research Program (MHRP): Status report and future research needs and directions. *NeuroToxicology*. 2006. 27. 733-736.
2. *Quintanar L.*: Manganese neurotoxicity: A bioinorganic chemist's perspective. *Inorganica Chimica Acta*. 2007. 361. 875-884.
3. *Schneider J.S., Decampa E., Koser A.J. et al.*: Effects of chronic manganese exposure on cognitive and motor functioning in non-human primates. *Brain Research*. 2006. 1118. 222-231.
4. *Morello M., Canini A., Mattioli P. et al.*: Sub-cellular localization of manganese in the basal ganglia of normal and manganese-treated rats - An electron spectroscopy imaging and electron energy-loss spectroscopy study. *NeuroToxicology*. 2008. 29. 60-72.
5. *Zatta P., Lucchini R., van Rensburg S.J. et al.*: The role of metals in neurodegenerative processes: aluminum, manganese, and zinc. *Brain Research Bulletin*. 2003. 62. 15-28.
6. *Kawamura R., Ikuta H., Fukuzumi S. et al.*: Intoxication by manganese in well water. *Kitasato Archives of Experimental Medicine*. 1941. 18. 145-171.
7. *Kondakis X.G., Makris N., Leotsinidis M. et al.*: Possible health effects of high manganese concentrations in drinking water. *Archives of Environmental Health*. 1989. 44. 175-178.
8. *Wasserman G.A., Liu X., Parvez F. et al.*: Water manganese exposure and children's intellectual function in Araihazar, Bangladesh. *Environ. Health Perspect.* 2006. 114. 124-129.
9. *Sthiannopkao S., Kim K.W., Sotham S. et al.*: Arsenic and manganese in tube well waters of Prey Veng and Kandal Provinces, Cambodia. *Applied Geochemistry*. 2008. 23. 1086-1093.
10. *Wolf A., Wright R., Amarasiriwardena C. et al.*: A child with chronic manganese exposure from drinking water. *Environ. Health Perspect.* 2002. 110. 313-616.
11. *Gerber G.B., Leonard A., Hantson P.H.*: Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of manganese compounds. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2002. 42. 25-34.
12. *Kilburn C.J.*: Manganese, malformations and motor disorders: findings in a manganese-exposed population. *NeuroToxicology*. 1987. 8. 421-429.
13. *Szabó A., Papp A., Nagymajtényi L.*: Alterations in the cortical and peripheral somatosensory evoked activity of rats treated with 3-nitropropionic acid. *Toxicology Letters*. 2006. 160. 212-217.
14. https://www.szegedivizmu.hu/public/hu/kornyezetvedelem_szegedivizminosege.html
15. *Elbetieha A., Bataineh H., Darmani H. et al.*: Effects of long-term exposure to manganese chloride on fertility of male and female mice. *Toxicology Letters*. 2001. 119. 193-201.
16. *Bowman W.C., Rand M. J.*: *Textbook of Pharmacology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1980. pp. 7-15
17. *Li G.J., Choi B.S., Wang, X. et al.*: Molecular mechanism of distorted iron regulation in the blood-CSF barrier and regional blood-brain barrier following in vivo subchronic manganese exposure. *NeuroToxicology*. 2006. 27. 737-744.
18. *Vezér T., Papp A., Hoyk Zs. et al.*: Behavioral and neurotoxicological effects of subchronic manganese exposure in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2005. 19. 797-810.
19. *Centonze D., Gubellini P., Bernardi G. et al.*: Impaired excitatory transmission in the striatum of rats chronically intoxicated with manganese. *Experimental Neurology*. 2001. 172. 469-476.

ZSUZSANNA MÁTÉ, ANDREA SZABÓ, GÁBOR OSZLÁNCZI,

ANDRÁS PAPP

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

H-6720 Szeged, Hungary

Dóm tér 10

Phone: 36-62-545-119

Fax: 36-62-545-120

E-mail: matezs@puhe.szote.u-szeged.hu

MODELLING PER OS MN EXPOSURE AND EXAMINING ITS FUNCTIONAL NERVOUS SYSTEM EFFECTS IN RATS

Abstract: Manganese (Mn) is an essential micronutrient in small amounts, but toxic when overdosed, affecting mainly the nervous system. Welding, mining and certain pesticides (Maneb) are important sources of occupational Mn exposure. The general population can be exposed by the anti-knock agent MMT (methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl), and by contaminated food or drinking water. Long-term exposure can lead to Mn accumulation in the central nervous system, resulting in deterioration of GABAergic, dopaminergic and cholinergic system and impaired mitochondrial function, finally causing Parkinson-like symptoms (manganism). Unfortunately these symptoms can be detected only at late stage of progression. Substances that influence the energy supply of cells (mitochondrial toxins) impair the functions of the nervous system that can be detected by electrophysiological methods. The aim of this study was to look for an electrophysiological parameter suitable for early detection of altered neurological functions caused by Mn. Therefore, a sensitive method proven by other mitochondrial toxins was used: evoked potentials (EPs) induced by double-pulse stimulation of the whisker pad were recorded from primary somatosensory cortex of anaesthetized rats, applying different interstimulus intervals.

Per os treatment lasted for 6 weeks. During this period, rats were treated with 2.5 mg/ml MnCl₂, dissolved in tap water. After the treatment period, electrophysiological measurement was done, and two records were taken per rat. Amplitude and peak latency as parameters of evoked potentials were measured and second: first ratio of these parameters was calculated. Beside electrophysiological measurements, Mn level was determined from blood samples to investigate Mn load.

Per os intake of MnCl₂ in the treated group significantly decreased the peak to peak amplitudes of the second EPs, compared to control. The change of the peak to peak amplitudes was due to the significant shrinkage of the positive peak amplitudes. Latencies of the second EPs showed significant decrease compared to the corresponding parameter of the first EPs (decreased second: first ratio). Blood Mn level of the treated rats was not altered compared to control values. Investigation of amplitude and latency of the somatosensory EPs proved to be effective in the follow up of Mn intoxication.

Keywords: manganese chloride, mitochondrial toxin, electrophysiology, evoked potentials, rat
