HelmholtzZentrum münchen
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ ΣΕ ΕΓΚΕΦΑΛΟΝΩΤΙΑΙΟ ΥΓΡΟ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΧΡΙΣΤΑΚΟΠΟΥΛΟΣ ΦΩΤΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΨΗ: Μ.ΟΞΕΝΚΙΟΥΝ-ΠΕΤΡΟΠΟΥΛΟΥ, ΚΑΘ. ΕΜΠ

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΛΙΟΣ 2014

Περιεχόμενα

Πρόλογος……1

Περίλιψη……..2

ABSTRACT……3

I. Θεωρητικό μέρος……4

1.1 Εισαγωγή**:** Ερευνητικά δεδομένα σχετικά με το Μαγγάνιο ως σήμερα……4

1.2 Πηγές της έκθεσης του ανθρώπου σε μαγγάνιο……6

2 Επιδημιολογικές μελέτες : η επίδραση του μαγγανίου για τον πληθυσμό……9

2.1 Η κατάσταση για τους ενήλικες……9

2.2 Η κατάσταση για τα παιδιά……12

2.3 Η κατάσταση για τα βρέφη……13

2.4 Η κατάσταση μετά την έκθεση……15

3 Τοξικολογικές έρευνες του μαγγανίου σε μοριακά και κυτταρικά επίπεδα……..17

3.1 Εμπόδια και μεταφορείς……17

3.2 Ένζυμα και δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)……19

3.3 Νευροδιαβιβαστές……23

4 Έμφαση στα είδη του Mn ……25

5 Χαρακτηριστικά βιοπαρακολούθησης μαγγανίου στον άνθρωπο……28

6. Η πορεία του Μαγγανίου μέσα στον οργανισμό……30

7. Η Εισαγωγή του Μαγγανίου στον εγκέφαλο……35

7.1. Αιματο-Εγκεφαλικός φραγμός και φραγμός Αίματος -Εγκεφαλονωτιαίου υγρού……35

7.2 Εγκεφαλονωπαίο υγρό (ΕΝΥ)……37

7.3 Η μεταφορά του Μαγγανίου διαμέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού……42

8. Βιολογικά Μόρια……45

8.1 gABA……45

8.2 Γλουταμινικό……45

8.3 Ακετυλοχολινεστεράση (AChE)……46

9. Σύμπλοκα του Μαγγανίου……47

9.1 Τρανσφερίνη……47

9. α_2- μακροσφαιρίνη……48

ΙΙ.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ……..49

10. Σχεδιασμός Πειραμάτων……..49

10.1 Παραλαβή δειγμάτων……..49

10.2 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικού Μαγγανίου και Σιδήρου……..49

10.3 Διαχωρισμός –Ειδοταυτοποίηση των ενώσεων των δειγμάτων……50

10.4 Ενεργότητα βιολογικών μορίων……50

10.5 Αναλογία δισθενούς / τρισθενούς σιδήρου……..50

10.6 Συσχέτιση ενεργότητας των βιολογικών μορίων με την συγκέντρωση του Μαγγανίου σε κάθε ένωση……51

11. Χημικά αντιδραστήρια-δείγματα……52

11.1 Δείγματα Εγκεφαλονωτιαίου υγρού……52

11.2 Αντιδραστήρια……53

12. Οργανολογία……55

12.1 Μέθοδος αποκλεισμού μεγέθους (SEC)……55

12.2 Μέθοδος Ιοντοεναλλαγής (IC)……55

12.3 Μέθοδος Φασματομετρίας Μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS) ……56

12.4 Μέθοδος Φασματομετρίας Οπτικής εκπομπής επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-OES)……..…56

12.5 Φασματόμετρο ανάγνωσης μικροπλακών……. 56

13. Αναλυτική διαδικασία……..…57

13.1 Έλεγχος ποιότητας……..57

13.2 Ολικός προσδιορισμός Μαγγανίου……..…57

13.3 Διαχωρισμός-Ειδοτραυτοποίηση των ενώσεων των δειγμάτων……58

13.4 Ενεργότητα Βιολογικών μορίων……..……58

13.5 Αναλογία δισθενούς/ τρισθενούς σιδήρου……62

14. Αποτελέσματα-Συζήτηση……..…63

14.1 Προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης του Μαγγανίου και του Σιδήρου……..63

14.2 Διαχωρισμός-Ειδοτραυτοποίηση των ενώσεων των δειγμάτων……64

14.3 Ενεργότητα Βιολογικών μορίων……..……66

14.4 Αναλογία δισθενούς/ τρισθενούς σιδήρου……..…69

14.5 Συσχέτιση συγκέντρωσης μεταβολικών μορίων και μεταβολικών ενζυμικών ενεργοτήτων που μπορεί να λειτουργήσουν σαν βιολογικοί δείκτες με συγκεντρώσεις Μαγγανίου και αναλόγία μορφών Σιδήρου……...71

15. Συμπεράσματα……78

16. Βιβλιογραφία……79

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει τίτλο ‘’ Βιο-συσχετίσεις Μαγγανίου σε εγκεφαλονωτιαίο υγρό’’ και διενεργήθηκε στα πλαίσια της εκπαιδευτικής διαδικασίας στη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Το πειραματικό μέρος της εργασίας πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια του ερευνητικού κέντρου Helmholtz Zentrum München, στο Μόναχο Γερμανίας και συγκεκριμένα στο Ερευνητικό Ινστιτούτο Περιβαλλοντικής Υγείας (German Research Center for Environmental Health) στα πλαίσια του προγράμματος ανταλλαγής φοιτητών ‘’Erasmus’’ της Ευρωπαϊκής Ένωσης υπό την επίβλεψη του καθηγητή Berhard Michalke και της καθηγήτριας Όξενκιουν – Πετροπούλου (Οκτώβριος 2012-Μάρτιος 2013) .

Τον συντονισμό του συγκεκριμένου θέματος είχε η καθηγήτρια Μαρία Όξενκιουν-Πετροπούλου, Καθηγήτρια του Τομέα Χημικών Επιστημών, Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω για την συνεργασία μας και την δυνατότητα που μου προσέφερε να εργαστώ στο εξωτερικό και να αποκτήσω μοναδικές εμπειρίες στο χώρο της έρευνας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Berhard Michalke για τις πολύτιμες συμβουλές του κατά την επίβλεψη της διπλωματικής μου εργασίας, για την ανιδιοτελή βοήθεια του και για την συνεργασία μας.

Περίληψη

Η επαγγελματική υπερέκθεση σε Μαγγάνιο (Mn) οδηγεί σε συσσώρευση του στον εγκέφαλο και έχει δειχθεί ότι προκαλεί προοδευτική, μόνιμη, νευρο-εκφυλιστική βλάβη με σύνδρομα παρόμοια με ιδιοπαθή Πάρκινσον. Το Mn μεταφέρεται από έναν ενεργό μηχανισμό διαμέσου των νευρικών φαγμών (NB) στον εγκέφαλο, αλλά μέχρι σήμερα, οι μηχανισμοί της νευροτοξικής δράσης του Mn είναι ελάχιστα κατανοητοί. Η παρούσα διπλωματική εργασία συμβάλλει στην έρευνα που σχετίζεται με την υπόθεση αν σχετικά μακρομόρια μεταφορείς Mn συσχετίζονται με την απελευθέρωση των γνωστών νευροδιαβιβαστών όπως γ-αμινοβουτιρικό οξύ (gABA), ακετυλοχολινεστεράση (AChE), γλουταμινικό (Glutamate) και τα ποσοστά δισθενούς (FeII) και του τρισθενούς (FeIII) σιδήρου.

Σε ανθρώπινο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (Cerebrospinal Fluid, CSF), Mn ανιχνεύθηκε κυρίως μέσω χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους (Size Exclusion Chromatography) συνδεδεμένο με ICP-MS σε κλάσματα που συνδέονται κυρίως με το κιτρικού και δευτερευόντως σε κλάσματα με τρανσφερίνη και α_2-μακροσφαιρίνη. Τα δείγματα μετρήθηκαν επίσης για ανίχνευση ενζυμικής δραστικότητας ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) με φθορισμό, ενώ το γλουταμινικό (Glutamate) προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά, το gABA μέσω μιας ένζυμο-συνδεδεμένης ανοσοπροσδιοριστικής δοκιμασίας (ELISA) και τέλος τα επίπεδα Fe(II) και Fe(III) μετρήθηκαν με τη χρήση χρωματογραφίας ιοντοεναλλαγής.

Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν και οι συντελεστές συσχέτισης υπολογίστηκαν για να διερευνηθεί κατά πόσον υπάρχουν συσχετίσεις μεταξύ συγκεκριμένων μακρομορίων μεταφορέων του Mn και το διερευνώμενων νευροδιαβιβαστών. Μια συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ του πρωτεϊνικού φορέα Mn, της α_2-μακροσφαιρίνης με το Fe (III), το gABA και την AChE συμβάλλοντας με τα δεδομένα αυτά στην σχετική έρευνα χρήσης βιοδεικτών για την πρόληψη νευροεκφυλιστικών ασθενειών που οφείλονται στην συσσώρευση του Mn.

ABSTRACT

Occupational manganese (Mn) overexposure leads to accumulation in the brain and has been shown to cause progressive, permanent, neuro-degenerative damage with syndromes similar to idiopathic Parkinsonism. Mn is transported by an active mechanism across neural barriers (NB) finally into the brain; but to date, modes of Mn neurotoxic action are poorly understood. This study investigates the hypothesis whether relevant Mn-carrier species are correlated with the release of known neurotransmitters such as γ-Aminobutyric acid (gABA), Acetylcholinesterase (AChE), Glutamate and the amounts of Fe(II) and Fe(III).

In human cerebrospinal fluid (CSF), Mn was found mainly in size exclusion chromatography (SEC) fractions associated mainly with citrate and in small amounts also with transferrin and α-2-macroglobulin. Samples were subjected to acetylcholinesterase activity measurement by fluorescence, while glutamate was determined spectrofotometrically, gABA by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Fe II, Fe III levels were measured using ion exchange chromatography, respectively.

The results were correlated and correlation coefficients were calculated for investigating whether there are interrelations between specific Mn carrier species and investigated neurotrasmitters. A specific correlation has been observed between α-2-macroglobulin and Fe III, gABA and AChE.

Ι. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Εισαγωγή : Ερευνητικά δεδομένα σχετικά με το μαγγάνιο ως σήμερα

Το Mn είναι ένα βασικό θρεπτικό συστατικό , σημαντικό για τις βιοχημικές αντιδράσεις πολλών ενζύμων συμπεριλαμβανομένων της Mn - εξαρτώμενης δισμουτάσης του υπεροξειδίου [1] . Παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του σιδήρου και είναι απαραίτητο για τη σωστή λειτουργία του εγκεφάλου. Σε αντίθεση με τις φυσιολογικές του ιδιότητες , αυξημένα επίπεδα μαγγανίου μπορεί να οδηγήσουν σε τοξικές νευρολογικές επιδράσεις , πιθανώς προκαλούμενες μέσω του μηχανισμού του οξειδωτικού στρες , ενώ η εισπνοή είναι η κύρια οδός εισαγωγής με άμεση επίδραση στην υγεία [2] . Αυτές οι νευροτοξικές επιδράσεις προκαλούν μια σειρά από συμπτώματα , όπως αδυναμία / κόπωση , σιελλοροια , κεφαλαλγία , διαταραχές του ύπνου , μυϊκούς πόνους και υπερτονία, μεταβολές στο βάδισμα, μειωμένη ικανότητα συντονισμού, ψευδαισθήσεις, και ψυχική ευερεθιστότητα, οδηγώντας τελικά σε μια Mn- επαγώμενη ασθένεια που μοιάζει με την ασθένεια Parkinson , που ονομάζεται manganism Μαγγανισμος. [3]

Σε αντίθεση με τη νόσο του Parkinson (PD), στον Μαγγανισμό ο τρόμος είναι λιγότερο εμφανής, ορθοστατικός και υψηλότερης συχνότητας αλλά χαμηλότερου εύρους και οι ασθενείς δεν εμφανίζουν παρατεταμένη ανταπόκριση στην αντικατάσταση της ντοπαμίνης. Η μαγνητική τομογραφία (MRI) σε ασθενείς με PD είναι φυσιολογική, ενώ μετά την τοξίνωση με Mn η σάρωση εμφανίζει «υψηλή» αλλαγή σήματος στην ωχρά σφαίρα , το ραβδωτό σώμα και μέλαινα ουσία σε διμερές επίπεδο . Σαρώσεις Fluorodopa χρησιμοποιώντας τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων είναι φυσιολογικές στην περίπτωση της τοξικότητας Mn , αλλά για PD υπάρχει μειωμένη ραβδωτή πρόσληψη στα οπίσθιο κέλυφος [2] .

Σε γενικές γραμμές , τα σενάρια έκθεσης σε Mn κατά τον τελευταίο αιώνα έχουν αλλάξει από τις οξείες, υψηλού επιπέδου συνθήκες έκθεσης, υπεύθυνες για την

εμφάνιση του manganism , σε χρόνια έκθεση σε χαμηλά επίπεδα του Mn . Από τη μία πλευρά , αυτή η αλλαγή μπορεί να οφείλεται σε βελτίωση της προστασίας στο χώρο εργασίας για τους εργαζομένους με δυνητικά υψηλή έκθεση σε Mn , όπως συγκολλητές , εργαζόμενους σε χυτήρια , εργαζόμενους σε εργοστάσια μπαταριών , κλπ. , με αποτέλεσμα τη μείωση των περιπτώσεων οξείου μαγγανισμού . Από την άλλη πλευρά , υπάρχει αύξηση της χρόνιας έκθεσης σε Mn σε ομάδες του πληθυσμού που ζουν κοντά σε βιομηχανικές ζώνες με εκπομπές σκόνης που περιέχουν Mn ή σε ομάδες του πληθυσμού που ζουν κοντά σε πολυσύχναστες οδικές αρτηρίες με υψηλές συγκεντρώσεις καυσαερίων που περιέχουν μεθυλοκυκλοπενταδιένυλοτρικαρβονυλικό μαγγάνιο (προσθετικό καυσίμων για την προστασία των καταλυτών). Τέτοια χρόνια έκθεση μπορεί να αυξήσει σταδιακά την εναπόθεση Mn και την τοξικότητα από την ωχρά σφαίρα σε ολόκληρη την περιοχή των βασικών γαγγλίων , συμπεριλαμβανομένης της μέλαινας ουσίας substantia nigra compacta που εμπλέκονται στην PD [4] .

Ψάχνοντας για τις πηγές και τις συνέπειες της εν λόγω χρόνιας έκθεσης , οι πρόσφατες ερευνητικές προσεγγίσεις επικεντρώθηκαν σε τρία βασικά θέματα , που το καθένα με τη σειρά του αφορά διαφορετικά ερευνητικά πεδία :

(1) Επιδημιολογικές μελέτες σχετικές με την έκθεση Mn με συναφείς κινδύνους για την υγεία , συμπεριλαμβανομένων των αυξημένων ποσοστών επικράτησης της νόσου του Πάρκινσον χρησιμοποιώντας μεθοδολογικά την εξέταση της έκθεσης Mn στη διάρκεια ζωής ενός ασθενούς .

(2)Έρευνες για μοριακές αλληλεπιδράσεις και μηχανισμούς , που περιλαμβάνουν τις πρόσφατες τοξικολογικές έρευνες Mn σε κυτταρικό επίπεδο , Mn - ειδογένεσης στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ) και νευρικό ιστό , καθώς και μελέτες σχετικά με Mn - μεταφορείς στις κυτταρικές μεμβράνες .

(3) Προσπάθεια για την βελτίωση της ανθρώπινης βιοπαρακολούθησης Mn .

Αξίζει να αναφερθεί ότι κάθε είδος μελέτης για την Mn τοξικότητα ή ειδογένεση, κατά κάποιο τρόπο βασίζεται στον αξιόπιστο προσδιορισμό στοιχείου ή στον

προσδιορισμό του είδους. Ως εκ τούτου, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η συλλογή του δείγματος και ο χειρισμός του είναι πολύ ευάλωτοι στις επιμολύνσεις.

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 5-7 ετών έχουν δημοσιευθεί μερικά άκρως κατατοπιστικά άρθρα ανασκόπησης σχετικά με το Mn. Εκτός από τα νέα ευρήματα σε αυτές τις ανασκοπήσεις των άρθρων καλύπτονται επίσης βασικές γνώσεις σχετικά με τον manganism , την τοξικολογία του Mn συμπεριλαμβανομένων ορισμένων βασικών μηχανισμών όπως είναι η απορρόφηση, η κατανομή , η απέκκριση και επομένως οι σχετικοί βιολογικοί χρόνοι ημιζωής και τελικά τα τυπικά επίπεδα μαγγανίου σε σωματικά υγρά ή σε ανθρώπινο ιστό [5 - 10] . Οι ποιο πρόσφατες ερευνητικές εργασίες εντοπίζονται κυρίως στην Mn - ειδογένεση που αποτελεί και ένα από τα βασικά σημεία έρευνας της παρούσας διπλωματικής εργασίας

1.2 Πηγές της έκθεσης του ανθρώπου σε μαγγάνιο

Οι πιο συχνά απαντόμενες μορφές του Mn στη φύση είναι στα δυσδιάλυτα οξείδια του MnO_2 και Mn_3O_4 μεταξύ των περισσότερων από 30 ορυκτών οξειδίων του Mn [11] . Υψηλότερα επίπεδα Mn μπορεί συνεπώς να βρεθούν στο έδαφος, σαν αποτέλεσμα της διάβρωσης του φλοιού πετρωμάτων , οδηγώντας σε περαιτέρω Mn εναπόθεση στα φυτά.

Η μέση ημερήσια πρόσληψη του Mn από τυπική δίαιτα στις ΗΠΑ , την Αγγλία και την Ολλανδία είναι μεταξύ 2,3 και 8,8mg ανά ημέρα , ενώ 2-3mg Mn ανά ημέρα πιστεύεται ότι είναι επαρκή για τους ενήλικες , και 8-9mg Mn ανά ημέρα είναι απολύτως ασφαλή [12] . Σύμφωνα με τον WHO (World Health Organization), υψηλότερες συγκεντρώσεις Mn βρέθηκαν σε ορισμένα τρόφιμα φυτικής προέλευσης , ειδικά το σιτάρι και το ρύζι (συγκεντρώσεις μεταξύ 10 mg / kg και 100 mg / kg) και τα φύλλα τσαγιού [13] . Μια μελέτη που διεξήχθη στον Καναδά έδειξε ότι περίπου το 54 % της συνολικής πρόσληψης Mn των ανθρώπων μέσω της τροφής, προέρχεται από τα σιτηρά [14] . Μεταξύ του γενικού πληθυσμού , η έκθεση Mn πρόεκυψε από την κατάποση μολυσμένων τροφίμων και πόσιμου νερού [15 - 17] .

Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις του Mn στα τρόφιμα μπορεί να ποικίλουν μεταξύ διαφορετικών χωρών και περιοχών . Για παράδειγμα , μια μελέτη στη Δυτική Βεγγάλη , στην Ινδία , αποκάλυψε πολύ υψηλότερα μέσα επίπεδα Mn στα μπαχαρικά από ό, τι στα σιτηρά και τα προϊόντα αρτοποιίας και τα λαχανικά (τιμές : λαχανικά 3,29 και 4,19 mg / kg , δημητριακά και προϊόντα αρτοποιίας 9,9 και 12,7 mg / kg και μπαχαρικά 42,4 και 54,2 mg / kg) [18] .

Επίσης, το πόσιμο νερό μπορεί να είναι μια πηγή υπερέκθεσης Mn όπως συμβαίνει σε ορισμένες περιοχές στο Μπαγκλαντές όπου η μέγιστη συγκέντρωση του Mn ήταν 2,0 mg / l, η οποία είναι τέσσερις φορές υψηλότερη από ό, τι επιτρεπτά επίπεδα στο πόσιμο νερό με βάση τον WHO [19] . Όμως , το πόσιμο νερό γενικά περιέχει λιγότερο από 100 μg Mn / l [20] . Καθώς η πρόσληψη και η απέκκριση Mn είναι συνήθως ρυθμισμένες με ακρίβεια, η δηλητηρίαση με Mn από του στόματος συμβαίνει σε σχετικά σπάνιες περιπτώσεις [21, 22]. Επίσης πρέπει να σημειωθεί ότι οι νευρολογικές επιπτώσεις της χρονίως χαμηλής συγκέντρωσης Mn πρόσληψης από τα τρόφιμα ή το πόσιμο νερό κατά τη διάρκεια μιας χρονικής περιόδου δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστές.

Αντιθέτως , εισπνοή υψηλότερων συγκεντρώσεων Mn είναι γνωστό ότι οδηγεί σε εναπόθεση Mn εντός του ραβδωτού σώματος και της παρεγκεφαλίδας , όπως μεταφέρεται ενεργά μέσω της οσφρητικής οδού [23] με συνέπεια ιδίως τα άτομα με επαγγελματική έκθεση σε Mn σκόνη να κινδυνεύουν με δηλητηρίαση . Μεταξύ αυτών των επαγγελμάτων κατατάσσονται οι βιομηχανίες παραγωγής αλουμινίου , συμπεριλαμβανομένων των συγκολλητών ,των εργαζομένων σε χυτήρια ή των εργατών σε εργοστάσια μπαταριών ξηρού στοιχείου [24, 25] , όπου τα επίπεδα της ημερήσιας έκθεσης σε Mn έχουν οριστεί στην οριακή τιμή 0,02 mg/m^3 [26] . Παρ 'όλα αυτά, σε μια μελέτη οι Nong et al. κάνοντας πειράματα σε αρουραίους που εκτέθηκαν σε Mn (με εισπνοή και τη διατροφή) και εφαρμόζοντας ένα φαρμακοκινητικό μοντέλο έδειξαν την ύπαρξη προτιμησιακών αυξήσεων σε ορισμένες περιοχές του εγκεφάλου μετά από έκθεση πάνω από 0,2 mg/m^3 με ταχεία (1 ή 2 εβδομάδες) επαναφορά σε επίπεδα σταθερής κατάστασης [27] . Πρέπει να αναφερθεί ότι , αφενός, η συγκέντρωση και από την άλλη πλευρά, η διάρκεια της έκθεσης σε Mn για την επαγωγή μιας πρώτης νευροτοξικής επίδρασης

είναι ακόμη υπό συζήτηση, δεδομένου ότι εξαρτάται από μία ποικιλία από επιμέρους παράγοντες (ηλικία, φύλο, θέση, γενετική, διατροφή και ούτω καθεξής) .

Είναι ενδιαφέρον, ότι το καθεστώς έκθεσης Mn μεταβάλλεται από την σχετικά υψηλής συγκέντρωσης επαγγελματική έκθεση κατά τη διάρκεια της επαγγελματικής ζωής των ενηλίκων προς έναν αυξανόμενο κίνδυνο από χαμηλής συγκέντρωσης , χρόνια , περιβαλλοντική έκθεση, όπου πλήττονται άτομα όλων των ηλικιών. Αυτό οφείλεται στην αύξηση των περιβαλλοντικών επιπέδων Mn που προκύπτουν από τη χρήση του αντικρουστικού πρόσθετου βενζίνης μεθυλοκυκλοπενταδιένυλοτρικαρβονυλικό μαγγάνιο (MMT) [28 - 31]. Περιστατικά τυχαίας έκθεσης σε Mn έχουν αναφερθεί στην κατ' οίκον παραγωγή παράνομων ναρκωτικών και τη μόλυνση των φρούτων και λαχανικών με το περιέχον Mn μυκητοκτόνο Maneb [32 - 34] .

Έτσι , νέες ουσίες εισάγονται συνεχώς σε ολόκληρο το περιβάλλον και η μόλυνση του εδάφους και των υδάτων από τις βιομηχανικές εκπομπές μπορεί να οδηγήσει σε αθροιστική νευροτοξικότητα λόγω της συνδυασμένης έκθεσης [34] . Αυτή η περίπτωση μπορεί ήδη να αρχίσει κατά τη βρεφική ηλικία , επειδή τα παρασκευάσματα για βρέφη περιέχουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα του Mn (70,0 έως 1289,0 μg / L) από ό, τι είτε το ανθρώπινο γάλα (μέσος όρος 4,9 μg / L) ή το αγελαδινό γάλα (μέσος όρος 25.2 μg / L) [5] και [35] . Οι επιπτώσεις της περιβαλλοντικής έκθεσης σε Mn είναι , επομένως, ένα εξαιρετικά κρίσιμο προς διερεύνηση ερευνητικό θέμα ιδιαίτερα ενδιαφέρον για την επιδημιολογία , όπου ένα ευρύ φάσμα του πληθυσμού παρακολουθείται για ένα μακροχρόνιο διάστημα.

2. Επιδημιολογικές μελέτες : η επίδραση του μαγγανίου για τον πληθυσμό

Ο Μαγγανισμός ιστορικά , πάντα ήταν συνδεδεμένος με την Mn δηλητηρίαση από Mn των ανθρακωρύχων, βιομηχανικών εργατών ή συγκολλητών, οι οποίοι λόγο επαγγέλματος ήταν εκτεθειμένοι σε σκόνη με υψηλές συγκεντρώσεις Mn κατά τη διάρκεια της επαγγελματικής τους ζωής. Αλλά πλέον με δεδομένη την προοδευτική βιομηχανοποίηση εκπομπών σε όλο τον κόσμο , την χρήση του Mn ως μυκητοκτόνου (Maneb , Mancozeb) ή ως πρόσθετο καυσίμου (MMT) σε ορισμένες χώρες, οι περιβαλλοντικές πηγές του Mn σήμερα αυξάνονται. Κατά συνέπεια, το πρόβλημα της νευροτοξικότητας από Mn έχει αρχίσει να είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τη δημόσια υγεία εξ αιτίας διαφορετικών παραγόντων σε διαφορετικούς πληθυσμούς [36] .

2.1 Η κατάσταση για τους ενήλικες

Όσον αφορά τις επιπτώσεις της περιβαλλοντικής έκθεσης σε Mn, στον πληθυσμό , η ομάδα του ερευνητή Lucchini [37] έχει ήδη προβεί στη διενέργεια εκτενούς μελέτης στην επαρχία της Μπρέσια, Ιταλία , τα τελευταία χρόνια . Στην αρχή ξεκίνησαν με την εκτίμηση επικράτησης των παρκινσονικών διαταραχών σε σχέση με την περιβαλλοντική έκθεση σε Mn κυρίως από τέσσερις βιομηχανίες σιδηρομεταλλευμάτων στην επαρχία αυτή , οι οποίες λειτουργούσαν μέχρι το 2001. Ως εκ τούτου, μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις Mn στην εναπομείνασα σκόνη του κάθε δήμου. Αυτό που σαφώς προέκυψε , ήταν ότι οι συγκεντρώσεις του Mn ήταν σημαντικά υψηλότερες στον περιβάλλοντα χώρο και στα κατάντη από τα βιομηχανικά εργοστάσια . Επιπλέον, τα αποτελέσματα έδειξαν επίσης ότι η περιβαλλοντική έκθεση σε Mn σχετίζεται με αυξημένη επικράτηση των παρκινσονικών διαταραχών. Αυτή η επικράτηση των παρκινσονικών διαταραχών με

έκθεση σε Mn θα μπορούσε επίσης να συνδέεται με γενετικούς παράγοντες. Ως εκ τούτου, οι Lucchini et al [4] ανέπτυξαν την έννοια της επιδεκτικότητας για να ταξινομήσουν τα άτομα σαν επιρρεπή για την PD.

Εκεί , συζητήθηκαν οι μεταλλάξεις των γονιδίων τα οποία παίζουν σημαντικό παθογενετικό ρόλο τόσο στον Παρκινσονισμό, όσο και στη ρύθμιση της Mn μεταφοράς και του μεταβολισμού του Mn. Μολονότι, σε ανθρώπους, οι ομοιοστατικοί μηχανισμοί υφίστανται συνεχή προσαρμογή των συντελεστών απορρόφησης και απέκκρισης για τη διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων και την αποφυγή ανεπάρκειας ή δηλητηρίασης με Mn , η ομάδα Lucchini παρατήρησε υποκλινικές και υπο- λειτουργικές μειώσεις στις νευροψυχολογικές δοκιμασίες . Αυτές κυρίως σχετίζονταν με τον κινητικό συντονισμό των λεπτών κινήσεων στο πλαίσιο της έκθεσης σε χαμηλότερο επίπεδο. Έτσι η χρόνια ισόβια έκθεση σε πολύ χαμηλά επίπεδα Mn θεωρήθηκε ως πιθανός παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου.

Ανησυχία για το ενδεχόμενο επιπλέον εκδήλωσης Mn νευροτοξικότητας , εκτός από τον κλασικό μαγγανισμό τέθηκε για πρώτη φορά από μια μελέτη που ανέφερε ότι μεταξύ 953 νέων κρουσμάτων της PD, η ηλικία κατά τη διάγνωση ήταν 17 χρόνια νωρίτερα σε 15 επαγγελματίες συγκολλητές από τους μη - συγκολλητές [38]. Αυτή η " άτυπη " Mn-σχετιζόμενη νευροτοξικότητα θα μπορούσε να εξηγηθεί από τις διαπιστώσεις ότι η εισροή και η διάχυση της εκροής σε έναν επαγγελματικά προσανατολισμένο εγκέφαλο προκαλούν υπερφόρτωση Mn στον εγκέφαλο με την παρατεταμένη υπερβολική έκθεση και η παρατεταμένη έκθεση πολύ χαμηλό επίπεδο [4] .

Με βάση αυτές τις πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες , οι Lucchini et al [4]. ανέπτυξαν την έννοια της ισόβιας έκθεσης σε Mn, με την υπόθεση ότι υπάρχει αυξημένος κίνδυνος παρκινσονικών διαταραχών , όπου υπάρχει ισόβια έκθεση σε χαμηλά επίπεδα Mn , αρχίζοντας από τις προγεννητικές έως τις μεγαλύτερες σε ηλικίες. Ωστόσο, οι μηχανισμοί της Mn νευροτοξικότητας σε χρόνια έκθεση σε χαμηλά επίπεδα δεν είναι επαρκώς γνωστοί ακόμη . Κατά συνέπεια, αυτοί οι συγγραφείς επίσης εφιστούν την προσοχή στην ανάγκη θεώρησης της

διαταραγμένης ηπατικής λειτουργίας ως σημαντικής για τη νευροτοξικότητα που σχετίζεται με το Mn, καθώς και έρευνες για το αν οι νευρώνες που μεταφέρουν οι εκκρίνουν το GABA (γ-αμινοβουτυρικό οξύ) ή μεταφέρουν το γλουταμινικό επηρεάζονται από ειδικά είδη Mn (Mn species).

Σε μια επόμενη μελέτη , οι Zacco et al . χρησιμοποίησαν φθορισμό ακτίνων X για τον προσδιορισμό βαρέων μετάλλων σε δείγματα αποτεθειμένης σκόνης , που είχαν συλλεγεί σε όλη την επαρχία , για να πραγματοποιήσουν μια συστηματική χαρτογράφηση [39] . Η χαρτογράφηση έδειξε ότι το Mn και άλλα μέταλλα ήταν πιο συχνά διανεμημένα στους δήμους όπου βρίσκονταν οι τέσσερις βιομηχανίες σιδηρομεταλλευμάτων. Έτσι, ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις βρέθηκαν στο βόρειο τμήμα της επαρχίας που ονομάζεται Valcamonica , όπου βρίσκονταν τρία από τα τέσσερα εργοστάσια. Υποστήριξαν ότι η εκπομπή του αέρα και η απόρριψη του νερού των εν λόγω βιομηχανιών ρύπαιναν το περιβάλλον .

Σε μια άλλη μελέτη , των Squitti et all. [40], έγινε σύγκριση ασθενών με Parkinson με ασθενείς χωρίς Parkinson, και η κάθε ομάδα περιελάμβανε κατοίκους της περιοχής Valcamonica και κατοίκους του υπόλοιπου τμήματος της Brescia. Ασθενείς που ζούσαν στη Valcamonica είχαν υψηλότερη συγκέντρωση Cu στον ορό , καθώς και χαμηλότερα επίπεδα Zn και Fe στον ορό σε σύγκριση με τους μάρτυρες από τη Valcamonica και τους ασθενείς από άλλες περιοχές. Είναι ενδιαφέρον το ότι ασθενείς και μάρτυρες από τη Valcamonica είχαν υψηλότερο επίπεδο Mn στο αίμα και στα ούρα σε σύγκριση με τους ασθενείς και τους μάρτυρες από την υπόλοιπη περιοχή. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι για την περιοχή αυτή , η έκθεση σε Mn κατά τη διάρκεια της ζωής μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο των νευροεκφυλιστικών διαταραχών μέσω ανισορροπίας στη συγκέντρωση μετάλλων (Cu , Fe , Zn), ειδικά όταν συνοδεύεται από μια υποκλινική ηπατική δυσλειτουργία.

Ωστόσο , σε γενικές γραμμές δεν είναι ακόμη εντελώς σαφές κατά πόσον οι αλλαγές σε Cu , Fe και Zη αιτιολογούν την αύξηση του κινδύνου , ή εάν τέτοιες ανισορροπίες είναι συνέπεια παθολογικών διεργασιών . Μια άλλη επιδημιολογική μελέτη διεξήχθη στο Τορόντο και στο Χάμιλτον του Καναδά . Οι έρευνες περιελάμβαναν τους συσχετισμούς μεταξύ PD και της έκθεσης σε βιομηχανικές

εκπομπές Mn , καθώς και καυσαερίων από οχήματα που οφείλονται στη χρήση του πρόσθετου MMT στην καναδική βενζίνη από το 1976 [41] . Σύμφωνα με τους συγγραφείς ο λόγος των πιθανοτήτων για μια ιατρική διάγνωση PD ήταν 1.034 ανά 10 ng/m3 αύξηση του Mn σε ολικά αιωρούμενα σωματίδια . Ως εκ τούτου , οι Φίνκελσταϊν και Jerrett [41] κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η έκθεση σε περιβαλλοντικό Mn αυξάνει την ηλικία της διάγνωσης της PD , ενισχύοντας έτσι την υπόθεση ότι η έκθεση σε Mn ενισχύει την φυσική απώλεια των νευρώνων που οφείλονται στη διαδικασία της γήρανσης . Αυτά τα ευρήματα και τα συμπεράσματα από Finkelstein και Jerrett [41] ήταν σύμφωνα με την προαναφερθείσα υπόθεση του αυξημένου κινδύνου των παρκινσονικών διαταραχών μετά την ισόβια έκθεση σε Mn , που εκφράζεται από τους Lucchini et al. [4] .

2.2 Η κατάσταση για τα παιδιά

Μια πρόσφατη μελέτη των Zoni et al. , έδειξε περαιτέρω για τη Valcamonica , ότι η δυσλειτουργία της οσφρητικής λειτουργίας και του συντονισμού των κινήσεων σε διαφορετικές ηλικιακές ομάδες, όπως τα παιδιά και οι ηλικιωμένοι μπορεί να προκαλείται από Mn, λόγω της μεταφοράς του Mn μέσω του οσφρητικού συστήματος που οδηγεί στην απορύθμιση των ντοπαμινεργικών [23] . Οι επιπτώσεις αυτών των υψηλών περιβαλλοντικών συγκεντρώσεων του Mn στη Valcamonica ήταν επίσης ενδιαφέρουσες σχετικά με τον νεότερο πληθυσμό . Ως εκ τούτου , οι Lucchini et al. διενέργησαν νευροσυμπεριφορικές δοκιμές σε εφήβους (ηλικίας 11-14) , οι οποίοι ζούσαν στη Valcamonica.

Σύμφωνα με τους συγγραφείς , αυτοί οι μαθητές είχαν μια σημαντική διαταραχή του συντονισμού των κινήσεων , της επιδεξιότητας των χεριών και της αναγνώρισης των οσμών , η οποία συνδέεται με το εδαφικό Mn . Επιπλέον , η ένταση του τρόμου συσχετιζόταν θετικά με το Mn στο αίμα και τα μαλλιά [42] . Τα δεδομένα αυτά ενισχύουν το γεγονός ότι ιστορικά περιβαλλοντική έκθεση σε Mn από την εκπομπή σιδηρομεταλλευμάτων μπορεί να οδηγήσει σε οσφρητική δυσλειτουργία και

κινητική δυσλειτουργία στην εφηβεία . Είναι αισιόδοξο ότι οι Lucchini et al . διαπίστωσαν ότι το Mn δεν μπορεί να προκαλέσει γνωστικές επιδράσεις στην εφηβεία σε αυτά τα χαμηλά επίπεδα έκθεσης [43] .

Οι επιδράσεις του Mn που βρίσκεται στο πόσιμο νερό, στα παιδιά, εξετάστηκαν περαιτέρω σε μια μελέτη στο Κεμπέκ του Καναδά . Οι Bouchard et al. ισχυρίστηκαν ότι οι μαθητές , οι οποίοι έλαβαν την υψηλότερη συγκέντρωση Mn στο νερό στο σπίτι (610 μg / L έναντι 160 μg / L της δεύτερης ομάδας) , παρουσίασαν υψηλότερη υπερκινητικότητα από την άλλη ομάδα [17] . Σε μια δεύτερη μελέτη , οι ίδιοι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η πρόσληψη Mn από το νερό της βρύσης συσχετίστηκε θετικά με την απομείωση της διανοητικής ικανότητας των μαθητών στην ηλικία των 6-13 ετών . Για παράδειγμα, μια αύξηση 10 -φορές σε Mn (στο νερό) συνδέθηκε με μια μείωση του IQ κατά 2,4 μονάδες ($p < 0,01$) , με διάμεση συγκέντρωση Mn στο νερό της βρύσης από 34 μg / L (εύρος: 1 - 2700 μg / L) [44] .

2.3 Η κατάσταση για τα βρέφη

Εστιάζοντας σε ακόμα νεότερα άτομα όπως τα νεογνά, αυτά διατρέχουν ακόμα πιο αυξημένο κίνδυνο λόγω της αυξημένης διαπερατότητας των νευρωνικών εμποδίων και της μειωμένης χολικής απέκκρισης . Ως εκ τούτου , η ανάγκη των μελετών σχετικά με την έκθεση Mn σε ανθρώπινα βρέφη είναι αναγκαία. Μία από τις λίγες μελέτες σχετικά με την έκθεση βρέφους Mn διεξήχθη από τους Zota et al . Εδώ , ελέγχθηκε η σχέση μεταξύ των επιπέδων Mn στο αίμα της μητέρας και τον ομφάλιο λώρο και το βάρος γέννησης σε μια ομάδα από 470 ζεύγη μητέρας-βρέφους που γεννήθηκε στην πολιτεία της Οτάβα στην Oklahoma [45] .

Σε αυτή τη μελέτη τα επίπεδα Mn του αίματος της μητέρας κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης συνδέθηκαν με το βάρος γέννησης σε τελειόμηνα νεογνά με μία μη γραμμική συσχέτιση. Το βάρος κατά τη γέννηση αυξήθηκε με επίπεδα Mn έως 3,1 μg / L , ενώ υπήρχε μια ελαφρά μείωση στο βάρος γέννησης σε υψηλότερα επίπεδα . Έτσι , συνιστάται η εφαρμογή μιας τέτοιας μελέτης σε υψηλής έκθεσης πληθυσμούς, ώστε να βρεθεί μια σαφής σχέση συσχέτισης. Είναι ενδιαφέρον σε

αυτό το πλαίσιο, ότι το επίπεδο Mn του αίματος σε έγκυες γυναίκες φαίνεται να είναι αυξημένο λόγω φυσιολογικών αιτιών [46] .

Όσον αφορά αυτό το θέμα , οι Ljung et al . προσπάθησαν να συσχετίσουν τα επίπεδα Mn της μητέρας με τα επίπεδα έκθεσης των βρεφών τους που τα θηλάζουν. Η μελέτη διεξήχθη σε μια περιοχή του Μπαγκλαντές, όπου τα επίπεδα Mn του νερού ξεπερνούσαν το επίπεδο αναφοράς της WHO περίπου κατά 40 % . Συγκεντρώσεις στα ούρα των μητέρων σχετίζονταν με τη συγκέντρωση Mn στο νερό , αλλά όχι στο αίμα ή στο μητρικό γάλα . Είναι ενδιαφέρον, ότι αυξημένη έκθεση της μητέρας σε Mn δεν οδηγεί κατ 'ανάγκη σε υπερβολική έκθεση στα θηλάζοντα βρέφη [47] .

Αυτός είναι ο λόγος που οι συγγραφείς τόνισαν τη σημασία του θηλασμού και σε περιοχές με υψηλά επίπεδα Mn . Είναι σημαντικό να έχουμε κατά νου ότι η απορρόφηση του Mn από το φαγητό ή το νερό και η κατανομή του στο σώμα αποτελεί μια απολύτως εξειδικευμένη ρύθμιση όπως είναι και η έκταση στην οποία το Mn περνά στα βρέφη από τις μητέρες τους . Είναι γνωστό ότι ο εγκέφαλος χρειάζεται Mn κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης για σημαντικά μεταλλοένζυμα , όπως η αργινάση, συνθετάση γλουταμίνης, πυροσταφυλική καρβοξυλάση , και δισμουτάση υπεροξειδίου . Παρ 'όλα αυτά , πριν και μετά τη γέννηση, η υπερέκθεση σε Mn για το έμβρυο ή το νεογνό μπορεί να έχει κρίσιμες συνέπειες για την ανάπτυξη του παιδιού με πιθανούς κινδύνους για το έμβρυο [45] .

Ζωικά μοντέλα έχουν ήδη δώσει ενδείξεις ότι η προγεννητική νευροτοξικότητα καθώς και η νευροτοξικότητα κατά την πρώιμη μεταγεννητική φάση μπορεί να προκαλέσει είτε άμεσα μια μείωση στον αριθμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων , ή να προκαλέσει μια αυξημένη ευαισθησία σε εκφυλισμό των νευρώνων αυτών με επακόλουθες περιβαλλοντικές προσβολές (όπως στην περίπτωση της περιοχής Valcamonica) ή με τη γήρανση από μόνη της [34] και [48] . Η επίδραση της έκθεσης σε πολλαπλές χημικές ουσίες ήδη στην πρώιμη παιδική ηλικία ήταν επίκεντρο μιας μελέτης από τους Henn et al . [49] .

Σε μια πολύχρονη μελέτη στην Πόλη του Μεξικού, 455 παιδιά που είχαν εγγραφεί κατά τη γέννηση παρακολουθούνταν μέχρι ηλικίας 36 μηνών παρέχοντας δείγματα αίματος για μέτρηση των συγκεντρώσεων Pb και Mn. Παρατηρήθηκε συνέργεια μεταξύ Pb και Mn, σύμφωνα με την οποία η τοξικότητα Pb αυξήθηκε μεταξύ των παιδιών με ταυτόχρονη υψηλή έκθεση Mn. Οι Henn et al. πρότειναν ότι η κοινή έκθεση στα δύο αυτά μέταλλα σχετίζεται με μεγαλύτερη ελλείμματα, τόσο στην ψυχική όσο και στην ψυχοκινητική ανάπτυξη, παρά η έκθεσης σε ένα μόνο μέταλλο. Σύμφωνα με αυτούς τους συγγραφείς η ηλικία των 12 μηνών αποτελεί ένα ευαίσθητο αναπτυξιακό παράθυρο ειδικά για αυτή την αλληλεπίδραση Pb-Mn, όχι όμως η ηλικία των 24-μηνών. Οι συγγραφείς τόνισαν τη σημασία των κοινών επιπτώσεων των χημικών ουσιών στην αξιολόγηση του κινδύνου και παρεμβάσεων στη δημόσια υγεία, ιδίως σε περιοχές όπου τα Mn και Pb στο περιβάλλον εμφανίζονται μαζί [46].

2.4 Η κατάσταση μετά την έκθεση

Επιδράσεις της επαγγελματικής έκθεσης Mn καιρό μετά από μια συνεχή απασχόληση με αναπνευστική έκθεση σε ένα ορισμένο ποσό Mn σπάνια τεκμηριώνεται . Είναι ενδιαφέρουσα μια μελέτη των Bouchard et al . , οι οποίοι πραγματοποίησαν μια μελέτη παρακολούθησης από το έτος 1990 έως το έτος 2004 σε εργαζόμενους που είχαν εκτεθεί σε Mn κατά τη διάρκεια του πρότερου εργασιακού τους βίου, στο Κεμπέκ του Καναδά . Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η προηγούμενη έκθεση σε Mn μπορεί να έχει μακροπρόθεσμες συνέπειες στα νευροψυχιατρικά συμπτώματα, καθώς αυτοί οι εργαζόμενοι παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα άγχους , εχθρότητας και κατάθλιψης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου [50] .

Τα ευρήματα αυτά, εντοπίζουν το επίκεντρο της Mn δηλητηρίασης σε άλλες νευρολογικές επιπτώσεις παρά στον τραυματισμό των νευρώνων , αλλά κυρίως προς ψυχολογικές επιπτώσεις και υπογραμμίζουν τον κίνδυνο του Mn ακόμα μετά

από ένα μεγάλο χρονικό διάστημα μετά από την οξεία έκθεση . Έτσι , είναι γνωστό σήμερα ότι ο χρόνος που παραμένει η νευροτοξικότητα είναι μεταβλητός και εξαρτώμενος από δύο παραμέτρους: τη διάρκεια της έκθεσης , καθώς και την περίοδο της ζωής, οπότε συμβαίνει [34] .

Λόγω των μεταβαλλόμενων συνθηκών της έκθεσης σε Mn, από την επαγγελματική στην περιβαλλοντική έκθεση, υφίσταται η ανάγκη για επιδημιολογικές μελέτες , ώστε να υπάρξει ικανοποιητική αξιολόγηση των κινδύνων από τους λόγω επαγγέλματος εκτιθέμενους πληθυσμούς στους ευάλωτους πληθυσμούς, όπως ηλικιωμένους και παιδιά [51] .

3. Τοξικολογικές έρευνες του μαγγανίου σε μοριακά και κυτταρικά επίπεδα

Το Mn είναι γνωστό ότι είναι ένας νευροτοξικός παράγοντας για περίπου 175 χρόνια, καθώς η προκύπτουσα ασθένεια που ονομάζεται μαγγανισμός περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1837 από τον James Couper , ο οποίος παρατήρησε παραπληγία κυρίως στα κάτω άκρα σε πέντε Σκωτσέζους άνδρες που εργάζονταν για την εξόρυξη μεταλλεύματος MnO_2 [52] .

Από τότε , διεξήχθησαν πολλές μελέτες, οι οποίες περιέγραφαν τα συμπτώματα της δηλητηρίασης Mn στον άνθρωπο , τις επιδράσεις σε τρωκτικά , αλλά και σε κυτταρικά μοντέλα. Μια πολύ καλή σύνοψη των μελετών αυτών για νευροπαθολογικές επιδράσεις της έκθεσης σε Mn, δημοσιεύθηκε από τους Aschner et al . [6], και εστιάζεται στους μηχανισμούς μεταφοράς Mn , τις επιπτώσεις του Mn στα συστήματα των νευροδιαβιβαστών , καθώς και στις επιπτώσεις του στη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και τη διαταραχή του κυτταρικού μεταβολισμού της ενέργειας.

3.1 Εμπόδια και μεταφορείς

Σύμφωνα με τις τρέχουσες γνώσεις , οι περιοχές του εγκεφάλου οι οποίες κυρίως επηρεάζονται από τη συσσώρευση του Mn στο manganism είναι η ωχρή σφαίρα και η μέλαινα ουσία , ενώ η τελευταία είναι γνωστό μάλλον εμπλέκεται στον παρκινσονισμό. Αυτές οι περιοχές πιστεύεται ότι είναι περαιτέρω εγκάρσια συνδεδεμένες με άλλα μέρη των βασικών γαγγλίων , π.χ. κερκοφόρο πυρήνα και κέλυφος , επικλινή πυρήνα και υποθαλαμικό πυρήνα [53].

Ανάμεσα σε αυτές τις περιοχές, το Mn βασικά στοχεύει σε ντοπαμινεργικα και GABAεργικα μονοπάτια , οδηγώντας ως εκ τούτου σε ελλείμματα στη γνωστική λειτουργία , καθώς και σε κινητικές διαταραχές όπως η βραδυκινησία, η δυσκαμψία, ο τρόμος ,οι διαταραχές βάδισης , η αστάθεια και η δυστονία ή / και η αταξία [54] .

Παρ 'όλα αυτά , ο ακριβής μηχανισμός της πρόσληψης Mn στον εγκέφαλο δεν έχει ακόμη ανακαλυφθεί. Μια πρόσφατη μελέτη σε χοίρο σε in vitro μοντέλα από τους Bornhorst et al. [55] συνέκρινε την επίδραση του $MnCl_2$ στο φραγμό αίματος - εγκεφαλονωτιαίου υγρού (BCB) καθώς και στο φραγμό αίματος-εγκεφάλου (BBB) . Βρέθηκε ότι το Mn επηρέασε τη BCB ισχυρότερα από ότι το BBB, ως εκ τούτου, το συμπέρασμα ήταν ότι μετά από στοματική πρόσληψη προτιμώμενη οδός για το Mn είναι η διάβαση μέσω BCB εντός του εγκεφάλου παρά μέσω BBB.

Αυτό επαναφέρει ένα άλλο ενδιαφέρον πεδίο έρευνας σχετικά με τις μηχανιστικές αλληλεπιδράσεις του Mn με άλλα ιόντα / στοιχεία στο σημείο της βλάβης .

Μέχρι στιγμής , είναι γενικά αποδεκτό ότι το Mn μπορεί να διασχίσει τα νευρωνικά εμπόδια μέσω πολλών φορέων και σε διάφορες καταστάσεις οξείδωσης , δεδομένου ότι η απορρόφηση του Mn , η μεταφορά , και τα επίπεδα των ιστών είναι αυστηρά ρυθμιζόμενα [56] .

Αν και οι μεταφορές Mn σε όλο τον BBB έχουν διερευνηθεί ευρέος όσον αφορά κυρίως τα ενεργά συστήματα μεταφορέα , ένα οριστικό αποτέλεσμα δεν είναι προς το παρόν διαθέσιμο [56] και [57] δεδομένου ότι οι πληροφορίες από διάφορες δημοσιεύσεις και ερευνητικές ομάδες εξακολουθούν να είναι αντιφατικές : Οι Aschner et al . [7] αναφέρουν: « Μέχρι σήμερα , οι ισχυρότερες αποδείξεις που βασίζονται σε μελέτες Mn, συνεπάγονται ένα φυσιολογικό ρόλο για τη μεταφορά του Mn τόσο με υποδοχείς τρανσφερίνης (TfR) όσο και με DMT - 1 ", [58-59].

Σε αντίθεση , ο Yokel [3] αναφέρει ότι «ο ρόλος του DMT - 1 παραμένει αμφιλεγόμενος. Υπάρχουν ενδείξεις, αλλά όχι άμεσες αποδείξεις που υποστηρίζουν το ρόλο του . " Οι δηλώσεις αυτές συμφωνούν περισσότερο με τους Crossgrove και Zheng [10] και Crossgrove και Yokel [60], καθώς και με τα αποτελέσματα από τους Bornhorst et al . [55], ο οποίοι διαπίστωσαν ότι " DMT1 δεν είναι ο κύριος μεταφορέας πρόσληψης Mn στον εγκέφαλο μέσω του φραγμού αίματος- CSF" .

Επίσης οι Wang et al. παρατήρησαν μια αύξηση της MTP1 (πρωτεΐνη μεταφορέας μετάλλου 1) και της διακίνησης TfR στο εκχύλισμα χοριοειδούς πλέγματος

αρουραίου (που περιλαμβάνει φραγμό αίματος -CSF) , μετά από έκθεση ιστών σε Mn ή σε Fe [61] .

Οι Gitler et al. [62] ανακοίνωσαν πρόσφατα ότι το γονίδιο Park9 - ένα γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την πρώιμη έναρξη του Παρκινσονισμού - μεταφέρει επίσης Mn. Αυτό κωδικοποιεί μια τύπου P διαμεμβρανική πρωτεΐνη ATPάσης . Περαιτέρω , τα μέλη της οικογενείας πρωτεϊνών μεταφορέων μετάλλου SLC39 έχουν μια υψηλή συγγένεια για το Mn [7] . Τέλος , ο κιτρικός μεταφορέας έχει επίσης εμπλακεί σε μεταφορά Mn διαμέσου του BBB [56] .

Επίσης έχει προταθεί ότι ένα Mn–σύμπλοκο κιτρικού μπορεί να αποτελέσει ένα υπόστρωμα για τον οργανικό μεταφορέα ανιόντων ή ενός μονοκαρβοξυλικού μεταφορέα (MCT) [3], που είναι σύμφωνο με την πιθανότητα ότι το MCT- 1 μεσολαβεί στην πρόσληψη του συμλόκου Mn- κιτρικού. Τέλος , οι Jursa and Smith [63] πιθανολογούν ότι η σερουλοπλασμίνη μπορεί να παίζει ένα ρόλο στην εκροή Mn στον εγκέφαλο

3.2 Ένζυμα και δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)

Το **οξειδωτικό στρες** αντιπροσωπεύει μια διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια και να αποκαθιστά τις βλάβες που προκαλούν. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου βλάπτουν όλα τα συστατικά του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA.

Οι Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) ταξινομούνται στις εξής τέσσερις κατηγορίες: (i) ελεύθερες ρίζες, όπως η ρίζα υδροξυλίου (·OH), (ii) ιόντα, όπως το υποχλωριώδες ανιόν (ClO^-), που προκύπτει από τη διάσταση του υποχλωριώδους οξέως (HClO), (iii) συνδυασμούς ελευθέρων ριζών και ιόντων, όπως το ανιόν υπεροξειδίου ($\cdot O2^-$) και (iv) μόρια, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου

(H_2O_2). Οι ελεύθερες ρίζες, που χαρακτηρίζονται από ένα μονήρες ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στιβάδα, είναι πολύ ασταθή μόρια με σύντομη διάρκεια ζωής, αφού αντιδρούν άμεσα με παρακείμενα μόρια, αποσπώντας από αυτά ένα ηλεκτρόνιο για να ζευγαρώσουν το δικό τους. Τα παρακείμενα μόρια μετατρέπονται έτσι τα ίδια σε ελεύθερες ρίζες και με αυτόν τον τρόπο διαταράσσεται η μοριακή τάξη και ξεκινά μία αλυσιδωτή αντίδραση που έχει ως αποτέλεσμα την κυτταρική βλάβη.

Μερικές από τις λιγότερο αντιδραστικές μορφές, όπως τα υπεροξείδια, είναι δυνατόν να μετατραπούν, κατόπιν αντιδράσεως με στοιχεία μετάπτωσης ή κινόνες, σε πιο επιθετικές μορφές (ελεύθερες ρίζες), ικανές να προκαλέσουν εκτεταμένες κυτταρικές βλάβες. Οι μακροπρόθεσμες κυτταρικές βλάβες που προκαλούνται με τον τρόπο αυτό αποδίδονται κυρίως στην προσβολή του DNA. Οι περισσότερες ROS παράγονται σε χαμηλά επίπεδα από τον αερόβιο μεταβολισμό και οι βλάβες που προκαλούν επιδιορθώνονται συνεχώς. Όταν όμως η συγκέντρωσή τους αυξηθεί υπέρμετρα, σε επίπεδα ικανά να προκαλέσουν κυτταρική νέκρωση, οι ROS προσβάλλουν τα μόρια του ATP και το κύτταρο, ανίκανο να ακολουθήσει το δρόμο του αποπτωτικού θανάτου, υφίσταται λύση.

Το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται μετά από υπερβολική προσφορά οξυγόνου (για παράδειγμα στους μύες κατά την έντονη άσκηση) ή ακτινοβόληση των ιστών (η αλληλεπίδραση της ιονίζουσας ακτινοβολίας με μόρια H_2O και O_2 παράγει ελεύθερες ρίζες) και συμβάλλει στην ιστική βλάβη.

Πιθανολογείται πως παίζει σημαντικό ρόλο σε νευροεκφυλιστικές νόσους συμπεριλαμβανομένων αυτών του Alzheimer, του Parkinson και του Huntington. Το οξειδωτικό στρες πιστεύεται επίσης ότι σχετίζεται με καρδιαγγειακές παθήσεις, καθώς η οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) στο αγγειακό ενδοθήλιο είναι προάγγελος της δημιουργίας αθηρωματικών πλακών. Είναι ακόμα γνωστός ο ρόλος του στον τραυματισμό κάποιου ιστού που εμφανίζεται μετά από επαναιμάτωση κατόπιν υποξίας. Αυτό συμβαίνει επειδή η αποκατάσταση της ροής του οξυγόνου, παρ' όλη την αναγκαιότητά της για την επιβίωση του ιστού, οδηγεί στο σχηματισμό ROS. Ο καπνός του τσιγάρου, με τα διάφορα εποξείδια και υπεροξείδια που περιέχει, καθώς και η εισπνοή ανόργανων σωματιδίων όπως η άσβεστος προκαλούν οξειδωτική βλάβη των πνευμόνων. Έχει διαπιστωθεί πως το

οξειδωτικό στρες εμπλέκεται και στην εμφάνιση πολλών άλλων ασθενειών, όπως δρεπανοκυτταρικής αναιμίας, μυοκαρδιακών βλαβών, σχιζοφρένειας, διπολικής διαταραχής και συνδρόμου εύθραυστου Χ χρωμοσώματος. Τέλος, το οξειδωτικό στρες φαίνεται ότι κρύβεται πίσω από το σύνδρομο της χρόνιας κοπώσεως.

Η κυριότερη πηγή ROS στον άνθρωπο είναι η διαρροή ενεργοποιημένου οξυγόνου από τα μιτοχόνδρια, το οποίο φυσιολογικά εμφανίζεται ως ενδιάμεσο κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και η τελική του τύχη είναι ο σχηματισμός μορίων νερού. Επιπρόσθετα, οι αντιδράσεις ουβικινόνης της αναπνευστικής αλυσίδας έχουν και αυτές μια ατυχή τάση να προκαλούν διαρροή ηλεκτρονίων απευθείας στο οξυγόνο. Συνολικά, μέχρι και 2% του οξυγόνου που εισέρχεται στην αναπνευστική αλυσίδα σχηματίζει ανιόντα υπεροξειδίου ($\cdot O_2^-$). Υποστηρίζεται ότι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν φλαβινοπρωτεΐνες επίσης συνεισφέρουν ένα ποσοστό των συνολικών ROS. Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) μπορούν να παράγουν ποικίλα ένζυμα, μεταξύ των οποίων αρκετές οξειδάσες. Τα κυριότερα από αυτά είναι η οξειδάση της ξανθίνης, η οξειδάση του NADPH και το σύμπλεγμα του κυτοχρώματος P450.

Προκειμένου να διατηρηθεί η κυτταρική ομοιόσταση, είναι αναγκαίο να εγκατασταθεί μια ισορροπία μεταξύ δημιουργίας και αδρανοποίησης των ROS. Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά όπλα που διαθέτει το κύτταρο είναι:

- Η **δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD),** που καταλύει την αντίδραση:

$\cdot O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$ (1)

- Η **καταλάση,** που καταλύει την αντίδραση:

$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ (2)

- Η **υπεροξειδάση της γλουταθειόνης,** που καταλύει την αντίδραση:

$2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$ (3)

Αρκετά ακόμη ένζυμα είναι γνωστό ότι έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, όπως η τρανσφεράση γλουταθειόνης-S και οι αφυδρογονάσες αλδεϋδών. Ως περισυλλέκτες ελευθέρων ριζών χαρακτηρίζονται μόρια που αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και τις καθιστούν ακίνδυνες. Οι βιταμίνες A, D και E, καθώς και διάφορα φυτοχημικά, όπως οι φαινόλες, οι πολυφαινόλες και τα φλαβινοειδή είναι εν δυνάμει

περισυλλέκτες ελευθέρων ριζών και μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης πολλών χρόνιων εκφυλιστικών νοσημάτων.

Το Mn είναι ένας συμπαράγοντας πολλών σημαντικών ενζύμων που εμπλέκονται στη διατήρηση της οξειδωτικής ισορροπίας, π.χ. η δισμουτάση υπεροξειδίου (SOD) [64], ή η εστεράση ακετυλοχολίνης (AChE) . Μια μελέτη σε κύτταρα νευροβλαστώματος που κατεργάστηκαν με $MnCl_2$ (200 και 800 μM) έδειξε μία σημαντική μείωση στις ενζυμικές ενεργότητες της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD) της καταλάσης (CAT) και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx). Είναι ενδιαφέρον, ότι συν-καλλιέργεια αυτών των κυττάρων με σιλυμαρίνη αύξησε την δραστικότητα σημαντικά, γεγονός που υποδηλώνει ότι η σιλυμαρίνη θα μπορούσε να διευκολύνει την προστασία έναντι της τοξικότητας Mn [65] . Αυτό ανοίγει ένα νέο πεδίο εφαρμογής της σιλυμαρίνης για μια πιθανή πρόληψη της τοξίνωσης του Mn.

Σε μια πρόσφατη μελέτη των Santos et al . έκαναν ενέσεις $MnCl_2$ σε αρουραίους σε δόσεις, 25 mg / kg / d. Βρέθηκε ότι η εγκεφαλική δραστηριότητα AChE ήταν σημαντικά μειωμένη , ενώ τα επίπεδα πρωτεΐνης Mn- SOD ήταν σημαντικά αυξημένα , το ίδιο και για τα επίπεδα των εγκεφαλικών F2- ισοπροστάνων (F2-IsoPs) και προσταγλανδίνης 2 (PGE2), τα οποία είναι φλεγμονώδεις μεσολαβητές , ως αποτέλεσμα της παραγωγής των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) [66] . Παρόμοια αποτελέσματα δημοσίευσε και ο Milatovic et al. [67] . Το ποιό πιθανό είναι η μειωμένη δραστικότητα της AChE να έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μιας σειράς ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών μεταβολικών μονοπατιών που συσσωρεύουν ενδοκυτταρικά ιόντα Ca^{+2} και παράγουν δραστικές μορφές οξυγόνου που οδηγούν σε οξειδωτικό στρες. Έτσι συσχετίζεται άμεσα η έκθεση σε Mn με τη δημιουργία οξειδωτικού στρες μέσω της μείωσης της δραστικότητας της AChE γεγονός που ερευνήθηκε και στη παρούσα διπλωματική εργασία.

Όσον αφορά την παραγωγή AChE σε αρουραίους, η κρίσιμη παράμετρος είναι η διάρκεια της έκθεσης σε Mn. Αρκετές μελέτες που αφορούν χαμηλές δόσεις Mn,

είχαν σαν αποτέλεσμα μια αύξηση στη δραστικότητα AChE [65] , [68] και [69] , ενώ μια χρόνια έκθεση για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα οδήγησε σε μείωση της δραστηριότητας AChE [66] , [70] και [71] , αντιστοίχως.

3.3 Νευροδιαβιβαστές

Το Mn δεν είναι μόνο συμπαράγοντας σημαντικών αντι- οξειδωτικών ενζύμων , αλλά επίσης και ενζύμων που εμπλέκονται στη σύνθεση νευροδιαβιβαστών (π.χ. συνθάση γλουταμίνης) καθώς και στον μεταβολισμό των νευροδιαβιβαστών [7] . Η επίδραση του Mn στην σύνθεση του γλουταμινικού και του νευροδιαβιβαστή GABA συνοψίζεται στην εργασία [72] . Σύμφωνα με αυτήν, υπάρχουν αντικρουόμενα δεδομένα για το κατά πόσον η συσσώρευση Mn οδηγεί σε μειώσεις ή αυξήσεις στα επίπεδα GABA, αλλά είναι αναμφισβήτητο ότι επηρεάζονται τα συστήματα ενεργοποίησης GABA των βασικών γαγγλίων . Μια νεώτερη μελέτη έδειξε μάλιστα , ότι η πρόσληψη Mn από τον εγκέφαλο ήταν αντιστρόφως ανάλογη με την πρόσληψη GABA σε διάστημα 6 εβδομάδων σε αρσενικούς και θηλυκούς αρουραίους [73] .

Οι Anderson et al. επίσης έδειξαν ότι σε ποντίκια η έκθεση σε Mn οδήγησε σε αύξηση στις εξωκυτταρικές συγκεντρώσεις του GABA μέσω διαφοροποιημένης έκφρασης πρωτεϊνών με λειτουργικό ρόλο σαν μεταφορείς ή υποδοχείς [74] . Σε αντίθεση οι Crooks et al . ανέφεραν ότι μια χαμηλή έκθεση σε Mn κυττάρων ποντικού δεν είχε σχεδόν καμία επίδραση στα ενδοκυττάρια επίπεδα GABA και στην απελευθέρωση GABA [75] .

Σε αντίθεση τα επίπεδα συγκεντρώσεων του ενδοκυτταρικού και εξωκυτταρικού γλουταμινικού αυξήθηκαν κατά 170 % - 198 % κατά την διάρκεια της έκθεσης σε Mn. Απ’ότι φαίνεται η συσχέτιση του GABA με το Mn είναι παρόμοια με την δραστικότητα της AChE, δηλαδή το σύστημα ενεργοποίησης GABA φαίνεται να εξαρτάται από την διάρκεια και την συγκέντρωση του παρεχόμενου Mn. Είναι

προφανές ότι η έκθεση σε Mn μεταβάλλει τα επίπεδα γλουταμινικού και GABA μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια της έκθεσης σε Mn [76] .

Αυτό μπορεί να οφείλεται στην πολυπλοκότητα της αλληλεπίδρασης αυτών των νευροδιαβιβαστών , συμπεριλαμβανομένης και της ντοπαμίνης . Έχει βρεθεί ότι οι μεταφορείς ντοπαμίνης στο ραβδωτό μειώθηκαν σε ασθενείς με Parkinson με ιστορικό έκθεσης σε Mn [63] και [64] .

4 Έμφαση στα είδη (species) του Mn

Έχει βρεθεί ότι σε ανθρώπινο ορό, κυρίως οι υψηλού μοριακού βάρους (HMM) Mn - ενώσεις αντιστοιχούν στην α-2-μακροσφαιρίνη και τα κλάσματα τρανσφερίνης/αλβουμίνης. Στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CSF) το Mn- κιτρικό αποτελεί κυρίως το κύριο χαμηλού μοριακού βάρους (LMM) Mn- είδος, κατά συνέπεια, είχε διατυπωθεί η υπόθεση ότι το Mn - κιτρικό αποτελεί το ποιό σημαντικό Mn-είδος που μετά την έκθεση σε Mn διαπερνά τους νευρονικούς φραγμούς [9, 92].

Υπάρχουν κάποια βασικά ερωτήματα σχετικά με την Mn – ειδοταυτοποίηση που έπρεπε να απαντηθούν μέσα από τις πρόσφατες ερευνητικές μελέτες.
Αυτά τα ερωτήματα ήταν :

Ποιες είναι οι συγκεντρώσεις Mn - ειδών στα νευρωνικά εμπόδια (NB) , δηλαδή ακριβώς πριν (στον ορό) και ακριβώς μετά (στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό- CSF);

a) Υπάρχουν ομοιότητες ή συσχετισμοί με άλλα είδη μετάλλων , π.χ. Fe ;

b) Εφόσον πρόσφατες έρευνες ειδογένεσης βασίστηκαν σε μη εκτιθέμενους ανθρώπους είναι σημαντικό να απαντηθεί ποιες Mn - ενώσεις είναι ανιχνεύσιμες μετά την έκθεση ; Για να απαντηθεί αυτό ποντίκια εκτέθηκαν σε μια χαμηλή δόση για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από την ανάλυση των ανθρωπίνων δειγμάτων.

c) Υπάρχουν σχέσεις αλληλεξάρτησης μεταξύ Mn - ειδών από ανθρώπινο ορό με εκείνα από εγκεφαλονωτιαίο υγρό;

d) Αυτές οι αλληλεξαρτήσεις εξαρτώνται από τη συγκέντρωση ;

e) Μπορούν να εξαχθούν καθαρές συσχετίσεις και να χρησιμοποιηθούν για τη Mn - βιοπαρακολούθηση ;

Οι Nischwitz et al. [57] ασχολήθηκαν με τα θέματα (a) και (b) : Αυτοί οι συγγραφείς ερεύνησαν την διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (BCB) για επιλεγμένα μέταλλα (Mn , Fe, Cu , Zη , Mg και Ca) . Τους απασχόλησε η διατήρηση της σταθερότητας των Mn - ειδών κατά τη διάρκεια της ειδοταυτοποίησης. Ως εκ τούτου , χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC) σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP - MS). Το σημαντικότερο συμπέρασμα αυτής της μελέτης ήταν οι σημαντικές διαφορές στην κατανομή του μοριακού μεγέθους των ειδών των επιλεγμένων μετάλλων για το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CSF) και για δείγματα ορού .

Για το CSF αυτό υποτέθηκε ότι οφείλεται στην εκλεκτική διαπερατότητα των διαφόρων ειδών-φορέων μετάλλων από τον ορό κατά μήκος του BCB . Σε σχέση με το Mn, σχεδόν όλα τα είδη παρουσίασαν μικρή διαπερατότητα από τον ορό στο CSF εκτός από το Mn -κιτρικό κλάσμα , το οποίο ήταν σημαντικά εμπλουτισμένο . Στον ορό , Fe , Cu και Zn συνδέθηκαν κυρίως με είδη υψηλού μοριακού βάρους (HMM,) ενώ είδη χαμηλού μοριακού βάρους (LMM) προσδιορίστηκαν για το Mg και το Ca. Τα αποτελέσματα έδειξαν την παρουσία στον νευρωνικό φραγμό (NB) ενός μηχανισμού ελέγχου για είδη HMM ο οποίος είναι αποδυναμωμένος για τα είδη LMM όπως το Mn-κιτρικο κλάσμα γεγονός το οποίο αυξάνει τον κίνδυνο τοξικότητας μετά από υπερβολική έκθεση σε Mn .

Τα παραπάνω αποτελέσματα των Nischwitz et al. [57] ήταν σύμφωνα με εκείνα που δημοσίευσε ο Yokel [3, 93] .

Έχοντας ένα τόσο γρήγορο ρυθμό πρόσληψης, η εισροή Mn-κιτρικού στον εγκέφαλο είναι συγκρίσιμη με εκείνη της εισροής ιόντων Mn^{2+} , γεγονός που υποδηλώνει ότι είναι ένα σημαντικό Mn- είδος που εισέρχεται στον εγκέφαλο [57] . Δεδομένου ότι τα αποτελέσματα της ειδογένεσης των Nischwitz et al. [57] βασίστηκαν σε

ανθρώπινα σωματικά υγρά από μη εκτεθειμένους ανθρώπους, οι Diederich et al. [94] εξέτασαν Mn- είδη σε ορό αρουραίου και δείγματα του εγκεφάλου μετά από σαφώς καθορισμένα έκθεση , ως εκ τούτου, αντιμετώπισαν το θέμα (c).

Τα αποτελέσματα απέδειξαν την υπόθεση του σχηματισμού των LMM Mn - ειδών in vivo . Η πρόσληψη του ανόργανου Mn , η οποία προσομοιώθηκε με μία μόνο έκχυση, οδήγησε σε υπερφόρτωση των αρχικών HMM Mn- φορέων και προκάλεσε το σχηματισμό LMM Mn- ειδών σε ορούς αρουραίων εκτεθειμένων σε Mn όπου το Mn- κιτρικό παρατηρήθηκε σαν το κύριο κλάσμα των LMM Mn- ειδών.

Για την αντιμετώπιση των θεμάτων (d) και (e) , εκπονήθηκε μια μελέτη για τον έλεγχο πιθανών σχέσεων μεταξύ Mn - ειδών στον ορό ή στο πλάσμα και αντίστοιχα στο CSF [95] .

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι υπάρχει μια κρίσιμη συγκέντρωση Mn στον ορό (1.55 μg/L) που ρυθμίζει την συσχέτιση των Mn ειδών στον ορό και στο CSF. Κάτω από αυτή τη συγκέντρωση στον ορό πρωτεϊνικές μορφές που δεσμεύουν το Mn όπως Mn-τρανσφερίνη/αλβουμίνη έδειξαν μια πολύ καλή συσχέτιση με το ολικό Mn στον ορό και τον ολικό Mn στο CSF ενώ πάνω από αυτή την συγκέντρωση η αντίστοιχη συσχέτιση ήταν ικανοποιητική με την ποσότητα του Mn-κιτρικού στον ορό.

Η στατιστική ανάλυση επιβεβαίωσε τα ανωτέρω συμπεράσματα . Αυτό οδήγησε στην υπόθεση ότι η αυξημένη συγκέντρωση του Mn -κιτρικού στον ορό ή το πλάσμα θα μπορούσε να είναι ένας πολύτιμος δείκτης για αυξημένη συνολική συγκέντρωση Mn στο CSF (και τον εγκέφαλο), δηλαδή ένας βιοδείκτης για αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης Mn- εξαρτώμενων νευρολογικών διαταραχών.

5 Χαρακτηριστικά βιοπαρακολούθησης μαγγανίου στον άνθρωπο

Θα πρέπει να τονιστεί ότι τα συμπτώματα της δηλητηρίασης Mn , μετά την εκδήλωσή τους, συνήθως γίνονται προοδευτικά μη αναστρέψιμα , γεγονός που αντικατοπτρίζει σε κάποιο βαθμό την μόνιμη βλάβη των νευρωνικών δομών . Έτσι, η ανίχνευση ενός αξιόπιστου βιολογικού δείκτη για την πρόωρη έκθεση Mn αποτελεί ένα σημαντικό κεφάλαιο κλινικής έρευνας που σχετίζεται με την νευροτοξικότητα του Mn και την υγεία [7].

Για να είναι ένας δείκτης χρήσιμος πρέπει να εμφανίζει δοσοεξαρτώμενες αλλαγές που σχετίζονται με την εξωτερική έκθεση [95] .

Ωστόσο , οι μετρήσεις της εξωτερικής έκθεσης είναι συνήθως διαθέσιμες σε επαγγελματικούς χώρους και ως εκ τούτου τα επίπεδα της έκθεσης σε Mn δεν είναι γνωστά . Μετρήσεις του Mn στο αίμα ή στα ούρα δεν συσχετίζονται άμεσα με τις εξωτερικές μετρήσεις έκθεσης και έχουν μικρή αξία για τον καθορισμό των εσωτερικών επιπέδων έκθεσης , καθώς η κύρια οδός απέκκρισης είναι μέσω της χολής ή τα κόπρανα (> 95 %) [97] .

Παρ' όλα αυτά, οι συγκεντρώσεις Mn στο πλάσμα και ορό έχουν αξιολογηθεί εκτενώς, αλλά μόνο με περιορισμένη επιτυχία. Μια μελέτη από τους Smith et al., [97] έδειξε ότι η σημασία της χρήσης της συγκέντρωσης Mn στο αίμα όταν χρησιμοποιηθεί σαν βιοδείκτης είναι περιορισμένη και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις παραμέτρους της έκθεσης. Βρέθηκε ότι κατά τη διάρκεια της έκθεσης, το Mn αποθηκεύεται στα οστά (παρόμοια με Ca) και αργότερα μεταφέρεται στο αίμα και αν η έκθεση μειωθεί εξαλείφεται οπότε δεν επιτρέπει την εκτίμηση της ιστορικής συσσώρευσης Mn στο σώμα [7] . Έτσι, μόνο σε μία βάση σύγκρισης εντός μιας ομάδας, τα επίπεδα Mn στον ορό μπορούν να χρησιμεύσουν αρκετά καλά ως δείκτης της πρόσφατης έκθεσης του Mn. Ωστόσο, μπορεί να υπάρξει μια σχετικά μεγάλη διακύμανση στην συγκέντρωση Mn στο αίμα μεταξύ των ατόμων, που οφείλεται είτε σε δίαιτα ή σε άλλες περιβαλλοντικές επιρροές, και έτσι αποκλείει τη συγκέντρωση Mn στο αίμα για κλινικές χρήσεις . Στην πιλοτική μελέτη

τους οι Hoet et al . [98] ανίχνευσαν σε συγκολλητές αυξημένες τιμές Mn σε σχέση με τους μη συγκολλητές(1.5 έναντι 2.0 μg / L). Αυτά τα ευρήματα προφανώς συμπίπτουν με την διαπίστωση των Smith et al . [97] " Τα επίπεδα Mn χρησιμεύουν σαν δείκτης της πρόσφατης έκθεσης Mn μόνο με βάση τη σύγκριση εντός μιας ομάδας ".

Άλλοι βιοδείκτες θεωρούνται οι Fe και Mn πρωτεΐνες ορού, όπως η φερριτίνη ή τρανσφερίνης (Tf) ή τα επίπεδα του υποδοχέα της τρανσφερίνης (TfR). Τα επίπεδα του TfR φαίνεται να μειώνονται, ενώ η φερριτίνη και τα επίπεδα του Tf αυξήθηκαν σε συγκολλητές που επαγγελματικά εκτίθενται σε υψηλά επίπεδα Mn [99] .

Η ερευνητική ομάδα του Καθηγητή Michalke στην οποία εκπονήθηκε η παρούσα διπλωματική εργασία τα τελευταία χρόνια προσπαθεί να συσχετίσει Mn είδη στον ορό και συγκεντρώσεις Mn στο CSF για την ανάπτυξη μιας στρατηγικής βιοκαταγραφής του εγκεφάλου και κομμάτι αυτής της έρευνας αποτέλεσε και η παρούσα εργασία. Έτσι βρέθηκε ότι ακόμη και ελαφρώς αυξημένες συγκεντρώσεις Mn σε ορό ή πλάσμα συσχετίζονται με αυξημένα επίπεδα Mn- κιτρικού και, περαιτέρω, ότι αυτή η αυξημένη συγκέντρωση Mn- κιτρικού συσχετίζεται σημαντικά με τη συνολική ανίχνευση Mn στο CSF. Αυτές οι συσχετίσεις θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ανθρώπινη βιοκαταγραφή Mn- κιτρικού στον ορό / πλάσμα που ενεργεί ως Mn βιοδείκτης [95] . Αυτός περαιτέρω μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για να προσδιοριστεί η πρώιμη τοξίνωση Mn στο ανθρώπινο σώμα και , συνεπώς, διευκολύνουν την πρόληψη του μαγγανισμού ή μακροχρόνια του Mn- προκαλούμενου Παρκινσονισμού.

Υπάρχουν συσχετισμοί ή ακόμη σαφείς συσχετίσεις μεταξύ συγκεκριμένων Mn ειδών στον εγκέφαλο και σε συγκεντρώσεις νευροδιαβιβαστών ή και ενζυμικών ενεργοτήτων της ακετυλοχολινεστεράσης οι οποίες ερευνήθηκαν και στη παρούσα διπλωματική εργασία. Υπάρχει επίσης συσχετισμός μεταξύ των Mn- ειδών και ανισορροπιών άλλων ειδών μετάλλου , όπως η ισορροπία του Fe (II) / Fe (III) , η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες.

Τέλος φαίνεται ότι υπάρχει ένας τεράστιος αριθμός μεταβολιτών που επηρεάζονται σημαντικά από το Mn και έτσι οι συσχετίσεις με συγκεκριμένα Mn - είδη μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον .

6. Η πορεία του Μαγγανίου μέσα στον οργανισμό

Όπως έχει προαναφερθεί, η ομάδα ανθρώπων, η οποία είναι ευάλωτη στις συνέπειες της συσσώρευσης Μαγγανίου στον εγκέφαλο, είναι εκείνοι που ασχολούνται με την εξαγωγή του συγκεκριμένου μετάλλου ή εκείνοι που δουλεύουν ή ζουν κοντά σε βιομηχανικές μονάδες οι οποίες χρησιμοποιούν το Μαγγάνιο για την παραγωγή ή την επεξεργασία άλλων μετάλλων. Σε αυτή τη κατηγορία ανθρώπων το Μαγγάνιο εισέρχεται στον οργανισμό τους μέσω του εισπνεόμενου αέρα.

Έτσι προκύπτει ένα μεγάλο ερώτημα πως το Μαγγάνιο μέσω του αέρα που εισπνέουμε εισέρχεται στο σώμα μας και καταλήγει στον εγκέφαλο. Υπάρχουν τρεις πιθανοί τρόποι με τους οποίους το εισπνεόμενο Μαγγάνιο εισέρχεται στο σώμα μας:

- Άμεση εισαγωγή στο ΚΝΣ (κεντρικό νευρικό σύστημα) μέσω των οσφρητικών υποδοχέων ή των νευρώνων του προσώπου
- Μεταφορά δια μέσου του πνευμονικού επιθηλίου και εν συνεχεία απόθεση στη λέμφο και στο αίμα
- Αποβολή από τον πνεύμονα μέσω των βλεωών και εν συνεχεία κατάποση και απορρόφηση του μετάλλου από τη γαστρεντερική περιοχή

Η σχετική συνεισφορά των τριών αυτών παραγόντων στη συσσώρευση του Μαγγανίου στο σώμα είναι δύσκολο να προσδιοριστεί. Από τη στιγμή που ο πνεύμονας είναι το πρώτο όργανο που εκτίθεται στο Μαγγάνιο, τα γεγονότα που θα συμβούν εκεί θα καθορίσουν τη βιολογική του διαθεσιμότητα. Η κατακάθιση στο πνεύμονα των σωματιδίων που εισπνέονται και περιέχουν Μαγγάνιο εξαρτάται από το μέγεθος, τη μάζα και τη πυκνότητα των σωματιδίων. Πιο συγκεκριμένα στο

αναπνευστικό σύστημα εισέρχονται σωματίδια με διάμετρο μικρότερη των 10 μm (PM_{10}), ενώ τα μεγαλύτερα συγκρατούνται από τη ρινική κοιλότητα. Όσο μικραίνει η διάμετρος των σωματιδίων, τόσο εισχωρούν αυτά βαθύτερα μέχρι τις πνευμονικές κυψελίδες (σχήμα 6-1). Τα σωματίδια με διάμετρο μικρότερη των 2,5μm ($PM_{2,5}$) έχουν τις δυσμενέστερες επιπτώσεις στην υγεία. Επίσης εκτός από την κατακάθιση των σωματιδίων υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη βιολογική διαθεσιμότητα του εισπνεόμενου Μαγγανίου όπως τη σύνθεση του Μαγγανίου μέσα στα σωματίδια, ο χρόνος έκθεσης μέσα στον πνεύμονα καθώς και πόσο αποτελεσματικά το μέταλλο έχει διαλυθεί από τους μακροφάγους μέσα στους πνεύμονες.

Ο πρώτος πιθανός τρόπος εισαγωγής του εισπνεόμενου Μαγγανίου μέσα στο σώμα είναι ένας τρόπος που επιτρέπει την απευθείας μεταφορά του στον εγκέφαλο χωρίς να διασχίζει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Η ποσότητα του Μαγγανίου που μεταφέρεται στον εγκέφαλο μέσω αυτής της οδού εξαρτάται από τη σύνθεση του στον εισπνεόμενο αέρα. Οι πιο διαλυτές μορφές απορροφούνται πιο αποτελεσματικά. Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι η πλειονότητα των πειραμάτων για την εξέταση αυτής της διαδικασίας έχουν γίνει σε πειραματόζωα (ποντίκια) και η αναγωγή των αποτελεσμάτων στον άνθρωπο πρέπει να κοιταχτεί με επιφύλαξη καθώς τα ποντίκια μπορεί να μην αποτελούν το ιδανικό παράδειγμα για τη σύγκριση τους με τον άνθρωπο, Αυτό οφείλεται στο ότι η ρινική κοιλότητα των ποντικιών είναι 20 φορές μεγαλύτερη σε σύγκριση με αυτής του ανθρώπου, επομένως στον άνθρωπο η παραπάνω διαδικασία μπορεί να μην έχει μεγάλη συνεισφορά στη συσσώρευση του Μαγγανίου στον εγκέφαλο.

Η δεύτερη διαδικασία που είναι αρμόδια για τη μεταφορά του Mn, η οποία και αντιπροσωπεύει πιθανώς το σημαντικότερο παράγοντα που συμβάλλει στην εισαγωγή του στο σώμα, είναι η μεταφορά διαμέσου του πνευμονικού επιθηλιακού στρώματος. Το Mn που λαμβάνεται στον πνεύμονα από τον εισπνεόμενο αέρα είναι πιθανώς ένα σύνθετο μίγμα διαλυτών και αδιάλυτων οξειδίων του Mn μαζί με άλλα μέταλλα. Τα σωματίδια που αποτίθενται στον πνεύμονα απομακρύνονται με μια διαδικασία κατάποσης και εν συνεχεία διάλυσης από τους πνευμονικούς μακροφάγους. Οι πνευμονικοί μακροφάγοι αντιπροσωπεύουν περίπου 3-5% όλων

των κυττάρων στη φατνιακή περιοχή, και η θεμελιώδης διαδικασία διάλυσης μετάλλων διευκολύνεται από το όξινο περιβάλλον μέσα στους μακροφάγους. Μόλις διαλυθεί, δύο πράγματα μπορούν να συμβούν: είτε το Mn είτε κάποιο άλλο ενδεχομένως κυτταροτοξικό συστατικό μέσα στο σωματίδιο μπορεί να προκαλέσει τον εκφυλισμό των πνευμονικών μακροφάγων ή κάποια συγκεκριμένη διαδικασία μεταφοράς μπορεί να απωθήσει το διαλυτοποιημένο μέταλλο πίσω στο πνευμονικό υγρό. Το διαλυτοποιημένο μέταλλο που απελευθερώνεται μεταφέρεται πιθανώς δια μέσου του επιθηλιακού στρώματος του πνεύμονα μέσω της τρανσφερίνης είτε και χωρίς αυτή. Αυτό εξαρτάται από το σθένος του Μαγγανίου. Εάν απελευθερωθεί τρισθενές Μαγγάνιο, τότε θα δεσμευθεί από την τρανσφερίνη (Tf) που είναι παρούσα μέσα στο πνευμονικό υγρό, ενώ το Mn^{2+} θα δεσμευθεί από άλλες πρωτεΐνες όπως η αλβιουμίνη. Οι πρωτεΐνες μεταφορείς όπως ο δισθενής μεταλλικός μεταφορέας (DMT1) και η φεροπρωτείνη είναι και οι δύο παρόντες μέσα στα φατνιακά επιθηλιακά κύτταρα, πιθανώς για να ενισχύσουν την μεταφορά των μετάλλων δια μέσου των φατνιακών κυττάρων, με σκοπό την απόθεση τους στο λεμφατικό σύστημα ή κατευθείαν στο αίμα. Εκτός από το σύστημα των ενδιάμεσων μεταφορέων, υπάρχει επίσης η δυνατότητα για το Μαγγάνιο που είναι ενωμένο με την τρανσφερίνη στο πνευμονικό υγρό, να μπορεί να μεταφερθεί άμεσα δια μέσου του επιθήλιου με τη διαδικασία του transcytosis, όπως πρόσφατα αναφέρθηκε για το σύμπλοκο GCSF-transferrin. (Widera et al., 2003α, β). Είναι επίσης εφικτό ότι μετά από μια εκτεταμένη χρονική περίοδο το συσσωρευμένο Mn και άλλα επιβλαβή συστατικά των σωματιδίων μπορεί να οδηγήσουν στη διάσπαση των επιθηλιακών κυττάρων, επιτρέποντας την άμεση πρόσβαση των μετάλλων στο κυκλοφορικό σύστημα Είναι δύσκολο να υπολογιστεί ο βαθμός, στον οποίο η εισαγωγή των σωματιδίων στον πνεύμονα, συμβάλλει στη γενική αύξηση του Μαγγανίου στο αίμα και στον εγκέφαλο, αλλά είναι πιθανό να αντιπροσωπεύσει τη κυριότερη διαδρομή για την είσοδο των μετάλλων μέσα στο σώμα. Αξίζει επίσης να επισημανθεί ότι ένα μεγάλο μέρος του Μαγγανίου που συσσωρεύεται στον πνεύμονα παραμένει εκεί για μεγάλες χρονικές περιόδους, έχοντας διφασικό χρόνο ημιζωής στον πνεύμονα από 2 έως 125 ημέρες. Έτσι επιτρέπεται στα βιολογικά συστήματα να διαλύσουν το μέταλλο μέσα στα σωματίδια και να ευνοήσουν την είσοδό του στα υγρά του σώματος.

Το υπόλοιπο Μαγγάνιο που υπάρχει μέσα στο πνευμονικό υγρό, είτε είναι σε μορφή σωματιδίου είτε είναι διαλυμένο και συνδεδεμένο με πρωτεΐνες είτε βρίσκεται στους μακροφάγους, θα απομακρυνθεί μέσω των βλεwών και τελικά θα εισαχθεί στο γαστρικό σύστημα. Το στομάχι, που έχει περίπου ρH 2, διαλύει εύκολα το σύμπλοκο του μετάλλου επιτρέποντας την εισαγωγή του στη συνέχεια στην εντερική οδό. Ο χρόνος εκκένωσης του στομαχιού ποικίλλει αρκετά από 1 έως 5 ώρες και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το περιεχόμενο του στομαχιού. Κατά συνέπεια, ο βαθμός στον οποίο το Μαγγάνιο είναι διαλυμένο μέσα στο στομάχι είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης και της σύνθεσής του καθώς επίσης και της παρουσίας άλλων τροφίμων. Το διαλυμένο Μαγγάνιο που απελευθερώνεται από το στομάχι στο δωδεκαδάκτυλο, μεταφέρεται στο αίμα μέσω των μεταφορικών πρωτεϊνών, DMT1 και φεροπρωτείνης .

Εκτός από τους προηγούμενους τρόπους εισαγωγής του Μαγγανίου στο σώμα, ένας άλλος τρόπος εισαγωγής είναι μέσω της διατροφής και πιο συγκεκριμένα αυτός ο τρόπος είναι και η κύρια πηγή πρόσληψης Μαγγανίου. Η παρουσία του Mn σε ποικίλα τρόφιμα εξηγεί το γεγονός ότι η ανεπάρκεια Mn στον ενήλικο είναι σχεδόν ανύπαρκτη. Η μέση καθημερινή λήψη υπολογίζεται μεταξύ 3 και 8 mg/ημέρα που είναι μεγαλύτερη από την συνιστώμενη ημερήσια επιτρεπτή λήψη (2.3 mg/ημέρα) που τίθενται από το FDA (food and drug administration) στην Αμερική. Υπερβολική πρόσληψη Μαγγανίου από τη δίαιτα είναι απίθανη, αφού μόνο το 5% του Μαγγανίου που λαμβάνεται πραγματικά καταλήγει στο σώμα μέσω των εντέρων. Το είδος του Μαγγανίου που εισάγεται στο αίμα από τα έντερα δεν είναι γνωστό αλλά θα παίξει σημαντικό ρόλο στην πορεία του Μαγγανίου για τη διατήρηση του στο σώμα, Το συκώτι διαδραματίζει έναν ζωτικής σημασίας ρόλο ρυθμίζοντας τα επίπεδα Μαγγανίου στον οργανισμό κυρίως επειδή συμβάλλει στην εξάλειψη του, Η ηπατική εξάλειψη του Μαγγανίου, εντούτοις, εξαρτάται κατά πολύ από το πρωτεϊνικό σύμπλοκο του Μαγγανίου που είναι παρόν στο αίμα. Το τρισθενές Μαγγάνιο που είναι η κυρίαρχη μορφή στο αίμα, είναι συνδεδεμένο στενά με την τρανσφερίνη και, υπό κανονικές συνθήκες , δεν είναι σε άμεσο ανταγωνισμό με το συνδεδεμένο Fe^{3+}, δεδομένου ότι μόνο 30% των διαθέσιμων περιοχών συνδέσεων της τρανσφερίνης δεσμεύονται από το σίδηρο. Αυτό θέτει μια

ενδιαφέρουσα ερώτηση ως προς τη μοίρα του Μαγγανίου στο αίμα σε συνθήκες αναιμίας ή όπου η τρανσφερίνη μπορεί να είναι ενωμένη καθ'ολοκλήρου με το σίδηρο. Το Mn^{+3} έχει υψηλή συγγένεια με τη τρανσφερίνη, αλλά η δυνατότητά της να ανταγωνιστεί το σίδηρο υπό αυτές τις συνθήκες δεν έχει εξεταστεί. Επειδή το τρισθενές Μαγγάνιο διαμορφώνει ένα σταθερό σύμπλοκο με τη τρανσφερίνη, η ηπατική εξάλειψη είναι σχετικά αργή και συγκρίσιμη με αυτήν για το σύμπλοκο TF-Fe^{+3}. Το δισθενές Μαγγάνιο στο αίμα είναι συνδεδεμένο με την a2-macroglobulin, αν και λόγω της μεγάλης αφθονίας αλβιουμίνης στο αίμα, ένα μεγάλο ποσοστό του Μαγγανίου θεωρείται ότι είναι ενωμένο με αυτή την πρωτεΐνη. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του Mn^{+2} στο αίμα και των πρωτεϊνών είναι μάλλον αδύνατη εξηγώντας την ηπατική εξάλειψή από το αίμα, Αντίθετα από το Fe^{+2}, η οξείδώση Mn^{+2} σε Mn^{+3} δεν εμφανίζεται αυθόρμητα στον οργανισμό και απαιτεί πιθανώς το ένζυμο, ceruloplasmin. Επίσης, το Mn^{+2} είναι ουσιαστικά η μόνη κατάσταση οξείδωσης του Μαγγανίου που εμφανίζεται ενδοκυτταρικά.

Κατά συνέπεια, με τη ρύθμιση του ποσοστού του Μαγγανίου στον οργανισμό το συκώτι μπορεί άμεσα να επηρεάσει το ποσοστό του μετάλλου στον εγκέφαλο. Είναι γνωστό ότι η χρόνια έκθεση οξυγονοκολλητών και μεταλλωρύχων σε Μαγγάνιο ανυψώνει τα επίπεδα Μαγγανίου στο αίμα και στον εγκέφαλο. Άρα σε αυτές τις συνθήκες το συκώτι είναι ανίκανο να διατηρήσει το Μαγγάνιο σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις. Αυτό μπορεί όμως να εξηγηθεί και από το γεγονός ότι ένα μεγάλο μέρος του Mn από τον εισπνεόμενο αέρα μεταφέρεται διαμέσου του πνευμονικού επιθηλίου στους ιστούς πριν καν συναντήσει το συκώτι.

7. Η Εισαγωγή του Μαγγανίου στον εγκέφαλο

Προτού αναλύσουμε τον τρόπο κατά τον οποίο το Μαγγάνιο εισέρχεται στον εγκέφαλο κρίνεται σκόπιμη η περιγραφή κάποιων τμημάτων του εγκεφάλου με σκοπό την κατανόηση της πορείας του Μαγγανίου από το αίμα στον εγκέφαλο.

7.1. Αιματο-Εγκεφαλικός φραγμός και φραγμός Αίματος - Εγκεφαλονωτιαίου υγρού

Το κεντρικό νευρικό σύστημα για να λειτουργεί φυσιολογικά χρειάζεται πολύ σταθερό περιβάλλον. Η σταθερότητα αυτή επιτυγχάνεται με την απομόνωση του νευρικού συστήματος από το κυκλοφορούν αίμα, λόγω της ύπαρξης του φραγμού μεταξύ αίματος και εγκεφάλου (αιματοεγκεφαλικός φραγμός) και του φραγμού μεταξύ αίματος και εγκεφαλονωτιαίου υγρού.

7.1.1 . Αιματο - εγκεφαλικός Φραγμός (BBB)

Τα πειράματα του PauI Ehrlich, το 1882, έδειξαν ότι ενδοαγγειακή έγχυση χρωστικών σε πειραματόζωα χρωμάτιζε όλους τους ιστούς του σώματος, εκτός από τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό, Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στην άποψη ότι υφίσταται ένας αιματοεγκεφαλικός φραγμός. Αποδείχτηκε ότι η διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους των μορίων και ευθέως ανάλογη με τη λιποδιαλυτότητα τους. Αέρια και νερό διέρχονται εύκολα από το φραγμό, ενώ η γλυκόζη και οι ηλεκτρολύτες βραδύτερα. Ο φραγμός είναι αδιαπέραστος για τις πρωτεΐνες του πλάσματος και άλλα οργανικά μόρια.

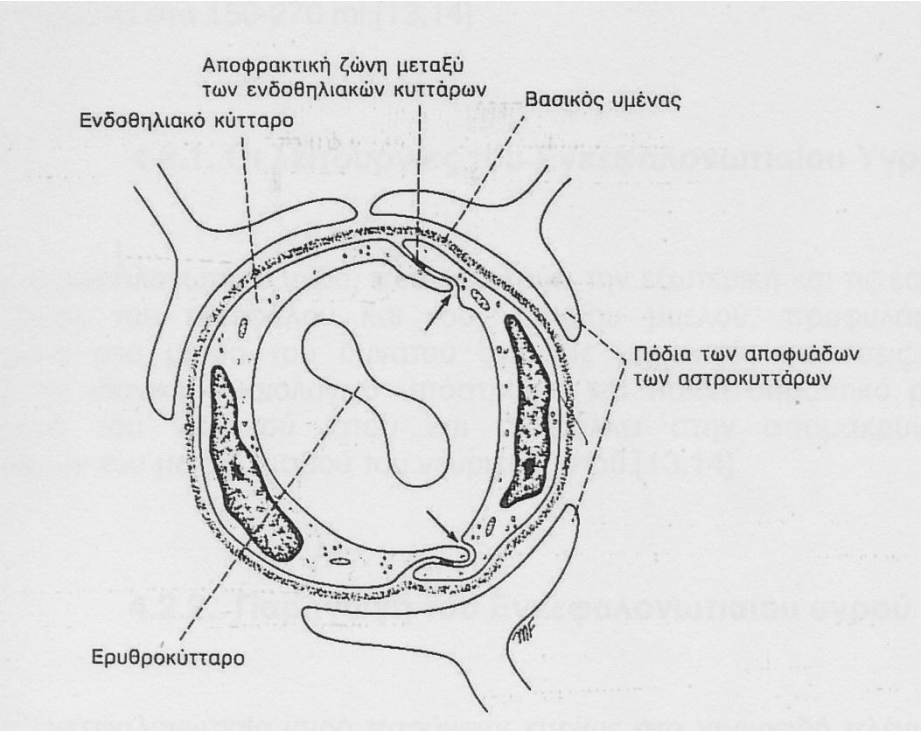
7.1.2. Δομή του Αιματο - Εγκεφαλικού Φραγμού

Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός (blood brain barrier, BBB) βρίσκεται μέσα και γύρω από εγκεφαλικά τριχοειδή κύτταρα και έχει φυσικές, χημικές και μεταβολικές ιδιότητες που επηρεάζουν την μετακίνηση των ουσιών. Η εξέταση του νευρικού ιστού στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο δείχνει ότι το αιμοφόρο τριχοειδές χωρίζεται από τον εξωκυττάριο χώρο μεταξύ των νευρώνων και της νευρολογίας, με τα παρακάτω:

- τα ενδοθηλιακά κύτταρα του τοιχώματος του τριχοειδούς
- το βασικό υμένα, που περιβάλλει το τριχοειδές έξω από τη στιβάδα των

ενδοθηλιακών κυττάρων

- τα πόδια των αποφυάδων των αστροκυττάρων που προσκολλώνται στην εξωτερική επιφάνεια του τοιχώματος του τριχοειδούς (σχήμα 7-1).



Σχήμα 7-1 : Εγκάρσια διατομή αιμοφόρου τριχοειδούς του κεντρικού νευρικού συστήματος, σε περιοχή όπου υφίσταται αιματο-εγκεφαλικός φραγμός

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα αποτελούνται από πρωτεΐνες οι οποίες είναι σφιχτά συνδεδεμένες και ενώνουν με ασφάλεια τα γειτονικά κύτταρα. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα περιβάλλονται από το βασικό υμένα ο οποίος αποτελείται από κολλαγόνα και άλλες λιπόφιλες πρωτεΐνες που μαζί επιβραδύνουν τη διάχυση των υδατοδιαλυτών ενώσεων. Τα αστροκύτταρα περιβάλλουν το τοίχωμα του τριχοειδούς σχεδόν αποκλειστικά, καλύπτοντας το 99% της επιφάνειας του τριχοειδούς τοιχώματος του εγκεφάλου αφήνοντας μόνο το 1% της επιφάνειας του τριχοειδούς τοιχώματος του εγκεφάλου να έρχεται σε επαφή με νευρώνες. Αυτή η ένωσή των ενδοθηλιακών και των νευρογλοικών κυττάρων (αστροκυττάρων) με το βασικό υμένα αποτελούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, ο οποίος εμποδίζει κινήσεις και ενώσεις μεταξύ εγκεφάλου και αίματος.

7.2 Εγκεφαλονωπαίο υγρό (ΕΝΥ)

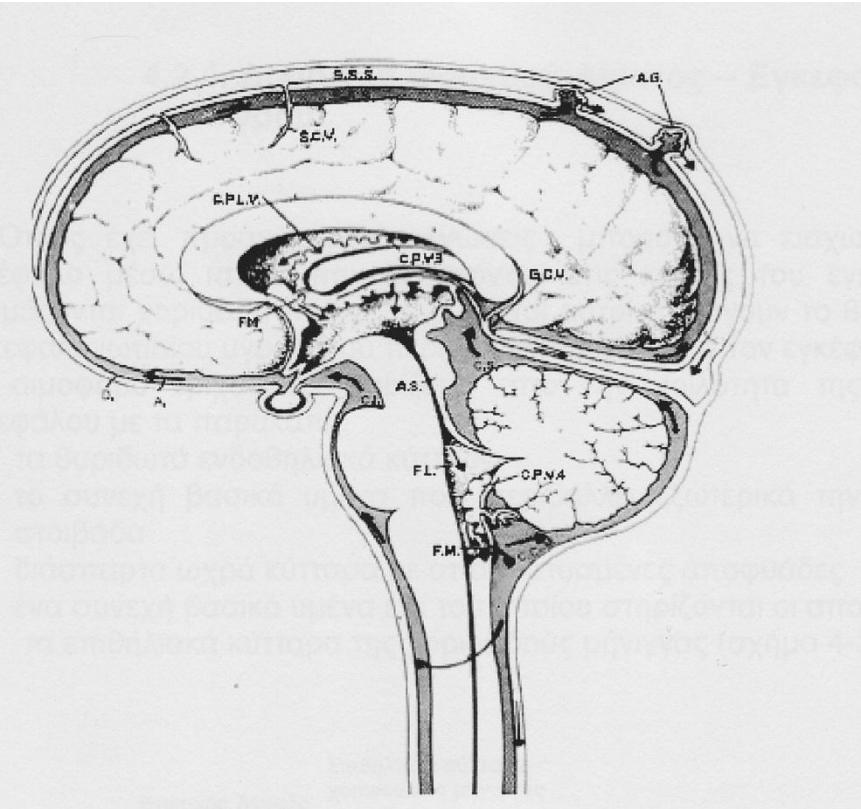
Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό είναι άχρωμο διαυγές υγρό. Περιέχει διαλυμένα ανόργανα άλατα, όπως και το πλάσμα του αίματος. Η περιεκτικότητα του σε γλυκόζη είναι η μισή του αίματος, ενώ υπάρχουν και ίχνη πρωτεϊνών. Τα κύτταρα είναι λίγα και κατά κύριο λόγο λεμφοκύτταρα. Ο φυσιολογικός αριθμός των λεμφοκυττάρων είναι από 0 έως 3 κύτταρα/mm^3. Στη πλάγια κατακεκλιμένη θέση η πίεση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού, όπως μετράται κατά την οσφυονωτιαία παρακέντηση, είναι 60 έως 150 mm στήλης ύδατος. Η πίεση αυτή αυξάνεται αμέσως κατά την έντονη προσπάθεια όπως το βήχα. Ο συνολικός όγκος του εγκεφαλονωτιαίου υγρού στους ανθρώπους έχει προσδιοριστεί στα 150-270mL

7.2.1. Οι λειτουργίες του Εγκεφαλονωτιαίου Υγρού

Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, που περιλούει την εξωτερική και τις εσωτερικές επιφάνειες του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού, προφυλάσσει τον εγκέφαλο στο μέτρο του δυνατού από τις μηχανικές κακώσεις. Επίσης θεωρείται ιδανικό φυσιολογικό υπόστρωμα και παίζει σημαντικό ρόλο στη διατροφή του νευρικού ιστού και συμβάλλει στην απομάκρυνση των προϊόντων του μεταβολισμού του νευρικού ιστού.

7.2.2. Παραγωγή του Εγκεφαλονωτιαίου υγρού

Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό παράγεται κυρίως στα χοριοειδή πλέγματα των πλαγίων, της τρίτης και τέταρτης κοιλίας (σχήμα 7-2). Ο ρυθμός παραγωγής του εγκεφαλονωτιαίου υγρού στον άντρα είναι 0,4mL/min. Σε σύγκριση με το μικρό του όγκο (150-270mL) ο ρυθμός παραγωγής του είναι συγκριτικά πολύ μεγαλύτερος. Αυτό δείχνει τη ζωτική σημασία που έχει η ανανέωση του υπάρχοντος υγρού με νέο υγρό και η απομάκρυνση των προϊόντων του μεταβολισμού του νευρικού ιστού του εγκεφάλου. Έχει υπολογιστεί ότι παράγονται 600mL εγκεφαλονωτιαίου υγρού ημερησίως που αρκεί για να αντικαταστήσει το υπάρχον ΕΝΥ τρεις με τέσσερις φορές.



Σχήμα 7-2: Σχηματική αναπαράσταση της πορείας του ΕΝΥ

Όπως φαίνεται στο σχήμα 7-2 το ΕΝΥ παράγεται στα χοριοειδή πλέγματα των πλάγιων κοιλιών (CPLV) και διέρχεται (μαύρα βέλη) στην τρίτη κοιλία οπού προστίθεται περισσότερο υγρό (CPV3). Έπειτα από τον υδραγωγό του Sylvius (AS) καταλήγει στη τέταρτή κοιλία (CPV4). Από την τέταρτη κοιλία, δια μέσου και των πλάγιων τμημάτων οροφής (FL,FM) φέρεται στον υποαραχνοειδή χώρο (SAS). Ακολούθως το ΕΝΥ ρέει μέσω του υποαραχνοειδούς χώρου γύρω από την έξω επιφάνεια του εγκεφαλικού φλοιού . Μικρή ποσότητα ΕΝΥ, μετά την έξοδο από τα τμήματα της οροφής (FL,FM) ρέει, προς τα κάτω στον υπόαραχνοειδή χώρο του νωτιαίου μυελού.

7.2.3. Φραγμός Αίματος - ΕγκεφαλονωτιαίουΥγρού(BCB)

Το νερό, τα αέρια και οι λιποδιαλυτές ουσίες διέρχονται ελεύθερα από το αίμα στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Μεγαλομοριακές ενώσεις, όπως πρωτεΐνες και οι περισσότερες εξόζες (εκτός από τη γλυκόζη), δεν μπορούν να περάσουν στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Συμπεραίνεται ότι στα χοιοειδή πλέγματα υφίσταται φραγμός, παρόμοιος με τον αιματοεγκεφαλικό.

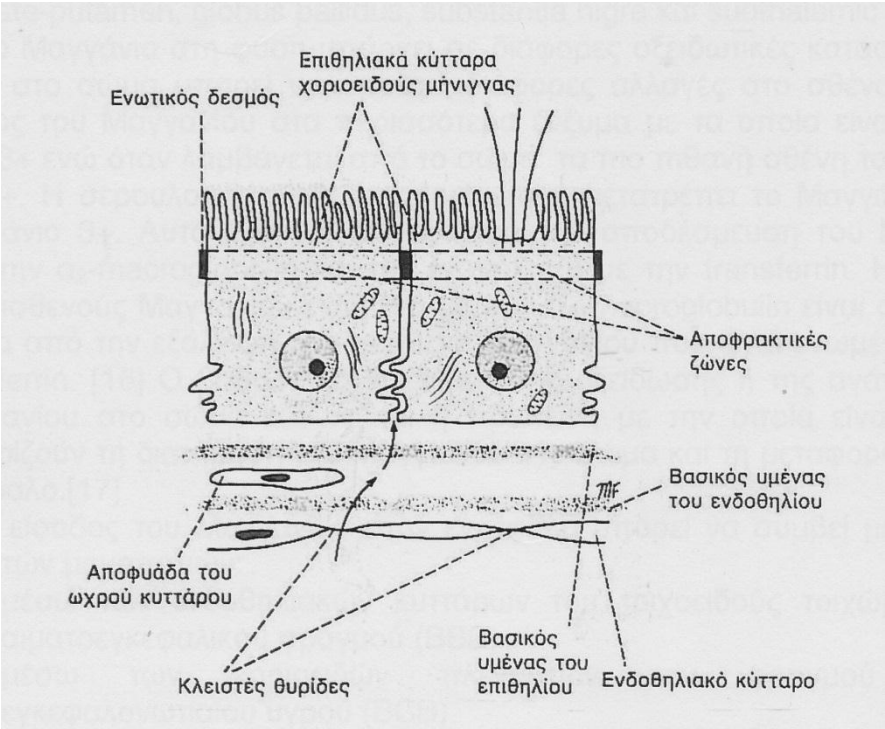
7.2.4. Δομή του Φραγμού Αίματος – Εγκεφαλονωτιαίου Υγρού

Όπως έχει προαναφερθεί ενώσεις μπορούν να εισχωρήσουν στον εγκέφαλο μέσω ιστών που βρίσκονται στις κοιλίες του εγκεφάλου που ονομάζονται χοριοειδή πλέγματα. Οι ιστοί αυτοί παράγουν το 80% με 90% του Εγκεφαλονωτιαίου υγρού που περιβάλλει και συντηρεί τον εγκέφαλο. Το αιμοφόρο τριχοειδές χωρίζεται από την κοιλότητα της κοιλίας του εγκεφάλου με τα παρακάτω:

- τα θυριδωτά ενδοθηλιακά κύτταρα
- το συνεχή βασικό υμένα που περιβάλλει εξωτερικά την ενδοθηλιακή

στοιβάδα

- διάσπαρτα ωχρά κύτταρα με αποπλατυσμένες αποφυάδες
- ένα συνεχή βασικό υμένα επί του οποίου στηρίζονται οι αποφυάδες
- τα επιθηλιακά κύτταρα της χοριοειδούς μήνιγγας (σχήμα 7-3).



Σχήμα 7-3: Διατομή λάχνης του χοριοειδούς πλέγματος

Φαίνεται ότι ο φραγμός οφείλεται σε ενωτικούς δεσμούς μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων της χοριοειδούς μήνιγγας. Οι ενώσεις που τελικά εισέρχονται στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό μπορούν να διαχυθούν από εκεί στα εγκεφαλικά κύτταρα αφού δεν υπάρχει κάποιος φραγμός μεταξύ του εγκεφαλονωτιαίου υγρού και του μεσοκυττάριου υγρού που περιβάλλουν τους νευρώνες και της νευρογλοίας. Τα χοριοειδή επιθηλιακά κύτταρα περιέχουν τις ενώσεις που αποτελούν τον φραγμό αίματος - εγκεφαλονωτιαίου υγρού ενώ τα τριχοειδή ενδοθηλιακά κύτταρα μέσα στο χοριοειδές πλέγμα δεν διαθέτουν τους ενωτικούς δεσμούς. Η συνολική επιφάνεια του χοριοειδούς επιθηλίου είναι περίπου 75cm^2, που αντιστοιχεί σε λιγότερη από τη μισή επιφάνεια του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (155cm^2).

7.3. Η μεταφορά του Μαγγανίου διαμέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού

Όπως έχει προαναφερθεί το Μαγγάνιο είναι απαραίτητο μέταλλο αλλά και τοξικό όταν ο άνθρωπος εκτεθεί σε σκόνη που περιέχει υψηλή συγκέντρωση σε Μαγγάνιο όπως συμβαίνει πολύ συχνά στη περίπτωση ανάκτησης του από τα μεταλλεύματα του. Το πιο ευάλωτο όργανο στη τοξικότητα του Μαγγανίου είναι αναμφισβήτητα ο εγκέφαλος. Η αρρώστια που συνδέεται με το Μαγγάνιο (Manganism) αφορά υψηλές ποσότητες Μαγγανίου στον εγκέφαλο, αρχικά σε γνωστές περιοχές που περιέχουν υψηλή συγκέντρωση σιδήρου όπως caudate-putamen, globus pallidus, substantia nigra και subthalamic nuclei.

Το Μαγγάνιο στη φύση υπάρχει σε διάφορες οξειδωτικές καταστάσεις και μέσα στο σώμα μπορεί να υποστεί διάφορες αλλαγές στο σθένος του. Το σθένος του Μαγγανίου στα περισσότερα ένζυμα με τα οποία είναι ενωμένο είναι 3+ ενώ όταν λαμβάνεται από το σώμα τα πιο πιθανή σθένη του είναι 2+ και 4+. Η σερουλοπλασμίνη (ceruloplasmin) μετατρέπει το Μαγγάνιο 2+ σε Μαγγάνιο 3+. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποδέσμευση του Μαγγανίου από την α_2-macroglobulin και την ένωση του με την transferrin. Η εξάλειψη του δισθενούς Μαγγανίου ενωμένο με την α_2-macroglobulin είναι σαφώς πιο ταχεία από την εξάλειψη του τρισθενή Μαγγανίου που είναι ενωμένος με την transferrin.t16] Ο βαθμός και η έκταση της οξείδωσης ή της ανάγωγης του Μαγγανίου στο σώμα καθώς και η πρωτεΐνη με την οποία είναι ενωμένο καθορίζουν τη διατήρηση του Μαγγανίου στο σώμα και τη μεταφορά του στον εγκέφαλο.

Η είσοδος του Μαγγανίου στον εγκέφαλο μπορεί να συμβεί μέσω τριών γνωστών μονοπατιών:

- μέσω των ενδοθηλιακών κυττάρων του τριχοειδούς τοιχώματος του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (BBB)

- μέσω των χοριοειδών πλεγμάτων του φραγμού αίματος - εγκεφαλονωτιαίου υγρού (BCB)
- μέσω των οσφρητικών νεύρων της ρινικής κοιλότητας κατευθείαν στον εγκέφαλο

Σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις Μαγγανίου στο αίμα (80nM) έχει αποδειχτεί ότι η είσοδος του Μαγγανίου στον εγκέφαλο συμβαίνει κυρίως μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις του Μαγγανίου στο αίμα (78μM) η είσοδος γίνεται κυρίως μέσω του φραγμού αίματος - εγκεφαλονωτιαίου υγρού.

Όσον αφορά τη μεταφορά του Μαγγανίου στον εγκέφαλο με αγγειακό τρόπο έχει προταθεί ότι οι διαφορετικές ενώσεις του Μαγγανίου και κατά συνέπεια οι διαφορετικές του οξειδωτικές καταστάσεις μπορεί να ρυθμίζουν τις ιδιότητες της μεταφοράς καθώς και τις ιδιαιτερότητες της. Το τρισθενές Μαγγάνιο (δευτερεύουσα οξειδωτική κατάσταση στο αίμα) έχει αποδειχτεί ότι εισέρχεται στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) μέσω ενός μηχανισμού υποδοχέα τρανσφερίνης (transferring receptor-mediated mechanism). Παρόλα αυτά έρευνες σε ποντίκια χωρίς τρανσφερίνη έδειξαν ότι η έλλειψη της δεν επηρεάζει την κατανομή του δισθενούς Μαγγανίου στους ιστούς μέσω του αίματος.

Σε αντίθεση με το τρισθενές Μαγγάνιο, το δισθενές Μαγγάνιο, μεταφέρεται στον εγκέφαλο είτε ως ελεύθερο ιόν είτε ενωμένο με μη εδική πρωτεΐνη. Πρόσφατες έρευνες [έχουν εστιάσει τη προσοχή τους στο δισθενή μεταλλικό μεταφορέα 1 (Divalent Metal Transporter-1 ή αλλιώς DMT-1) για τη μεταφορά του Μαγγανίου σε διάφορους ιστούς ένας εκ των οποίων είναι και ο εγκέφαλος. Μελετήθηκε ο ρόλος του ελλιπή αλληλομόρφου DMT-1 στη μεταφορά του Μαγγανίου δια μέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού σε ομόζυγα ποντίκια Belgrade (b/b), υποδηλώνοντας ότι μπορεί να υπηρετεί πιθανό μεταφορέα στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Σε αντίθεση με τα προηγούμενα η ερευνητική ομάδα του Yokel εισήγαγε την άποψη ότι το DMT-1 δεν παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά του Μαγγανίου στο ΚΝΣ. Προσδιορίστηκε ο συντελεστής μεταφοράς της εισροής διαφόρων μορφών του Μαγγανίου στον εγκέφαλο σε b/b και +/b Belgrade και Wistar ποντίκια με in ή situ

τεχνική διάχυσης στον εγκέφαλο. Δεν σημειώθηκαν σημαντικές αλλαγές στη μεταφορά του Μαγγανίου μεταξύ των Belgrade και Wistar ποντικιών οδηγώντας τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι το Μαγγάνιο διανέμεται δια μέσου του αιματοεγκεφαλκού φραγμού στον εγκέφαλο με έναν ή περισσότερους ενδιάμεσους μεταφορείς (carrier-mediated) διαφορετικούς από το DMT-1. Επίσης η σταθερά K_{in} (σταθερά εισόδου στον εγκέφαλο) για κάθε ένα από τα τρία είδη του Μαγγανίου (^{54}Mn, ^{54}Mn-citrate, ^{54}Mn-tranferin) που μελετήθηκαν από την ερευνητική ομάδα του Yokel δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των περιοχών του εγκεφάλου και των χοροειδών πλεγμάτων. Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι η οξειδωτική κατάσταση των ^{54}Mn και ^{54}Mn-citrate είναι 2+ ενώ της ^{54}Mn-tranferin είναι 3+. Ωστόσο παρατηρήθηκε ότι η K_{in} του εγκεφάλου για το ^{54}Mn-citrate ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με τη K_{in} του δισθενούς μαγγανικού ελευθέρου ιόντος και του τρισθενούς Μαγγανίου ενωμένου με την τρανσφερίνη σε κάποιες περιοχές του εγκεφάλου. Ακόμη το ραδιοϊσότοπο ^{55}Mn-citrate εμπόδισε την εισαγωγή του ^{54}Mn-citrate στον εγκέφαλο και το ^{55}Mn (στην 2+ οξειδωτική βαθμίδα) εμπόδισε την εισαγωγή του ^{54}Mn (στην 2+ οξειδωτική βαθμίδα) στον εγκέφαλο υποστηρίζοντας την άποψη για ενδιάμεσους μεταφορείς (carrier- mediated) κατά την εισαγωγή του Μαγγανίου στον εγκέφαλο. Επίσης αυτά τα πειράματα οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι το κιτρικό μαγγάνιο μπορεί να είναι το κυρίαρχο είδος του Μαγγανίου που εισέρχεται στον εγκέφαλο. Όσον αφορά την εκροή του Μαγγανίου από τον εγκέφαλο οι ίδιοι ερευνητές υποδήλωσαν την έλλειψη της ενεργητικής μεταφοράς του Μαγγανίου από το ΚΝΣ στο κυκλοφορικό σύστημα προτείνοντας μια πολύ αργή διαδικασία διάχυσης η οποία οδηγεί στη συσσώρευση του Μαγγανίου στον εγκέφαλο αφού η εισροή είναι ταχύτερη.

8. Βιολογικά Μόρια

8.1 gABA

Το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (gABA) , είναι ένα αμινοξύ που αποτελεί τον κύριο ανασταλτικό νευροδιαβιβαστή στον εγκέφαλο των θηλαστικών. Ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής σημαίνει ότι στη μετάδοση των σημάτων στους νευρώνες, σε όλο το νευρικό σύστημα, παράλληλα με τους νευροδιαβιβαστές που δρουν διεγερτικά στη μετάδοση του νευρικού σήματος, υπάρχουν οι ανασταλτικοί νευροδιαβιβαστές ώστε να διατηρείται ισορροπία στη μετάδοση του νευρικού σήματος σε όλο το νευρικό δίκτυο. Έτσι ελέγχεται και η μυϊκή ισχύ, μέσα από μια ισορροπία διεγερτικών και ανασταλτικών δράσεων, ώστε να μην έχουμε υπερτονία ή χαλάρωση των μυών. Το αμινοξύ αυτό δρα πάνω σε ειδικούς υποδοχείς που υπάρχουν στις νευρικές συνάψεις, οι οποίοι είναι πολλών ειδών. Το γ-αμινοβουτυρικό οξύ σχηματίζεται από το L-γλουταμινικό οξύ, το οποίο αποτελεί έναν άλλον σημαντικό νευροδιαβιβαστή που δρώντας πάνω σε ειδικούς υποδοχείς (τους NMDA υποδοχείς), είναι υπεύθυνο για τη διάνοιξη των καναλιών ασβεστίου των νευρικών κυττάρων, δρώντας διεγερτικά στη μετάδοση του σήματος, παίζοντας καθοριστικό ρόλο και στη διαδικασία της μάθησης και της μνήμης.

8.2 Γλουταμινικό (Glutamate)

Το γλουταμικό οξύ (Glutamate) είναι ένα από τα δύο όξινα πρωτεϊνικά αμινοξέα και είναι επίσης ένα βασικό μόριο του κυτταρικού μεταβολισμού. Στους ανθρώπους το γλουταμινικό έχει σημαντικό ρόλο τόσο στην αποικοδόμηση των αμινοξέων όσο και στην διάθεση της περίσσειας του αζώτου. Το γλουταμινικό είναι ο σε μεγαλύτερη περίσσια ταχύς διεγερτικός νευροδιαβιβαστής του νευρικού συστήματος των θηλαστικών. Πιστεύεται ότι εμπλέκεται στη μάθηση και τη μνήμη και εμφανίζεται να εμπλέκεται σε ασθένειες όπως αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση, λαθυρισμός, αυτισμός, κάποιες μορφές νοητικής υστέρησης και στη

νόσο του Alzheimer. Ακόμα βρίσκεται σε μια ευρεία ποικιλία τροφίμων, και έχει χρησιμοποιηθεί ως ενισχυτικό γεύσης στη βιομηχανία τροφίμων.

8.3 Ακετυλοχολινεστεράση (AChE)

Η ακετυλοχολινεστεράση (AChE), είναι ένα ένζυμο που αποικοδομεί με την υδρολυτική του ιδιότητα το νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη, παράγοντας χολίνη και μια οξική ομάδα. Η ακετυλοχολινεστεράση έχει μεγάλη καταλυτική ενεργότητα (25000 μόρια ακετυλοχολίης /δευτερόλεπτο) ενώ τα προϊόντα αποικοδόμησης ανακυκλώνονται. Οι ακετυλοχολινεστεράσες είναι κρίσιμες τόσο για την ανάπτυξη όσο και για την λειτουργία του νευρικούσυστήματος. Η χρήση αναστολέων της AChE ως θεραπευτικοί παράγοντες και σε φυτοφάρμακα έχει κεντρίσει λεπτομερείς έρευνες των χολινεστερασών από την ανακάλυψη τους από τους από τον Dale. Η ακετυλοχολίνη (ACh) είναι σημαντικός νευροδιαβιβαστής στο κεντρικό και στο περιφερειακό νευρικό σύστημα. Στον εγκέφαλο υπάρχουν πολλές περιοχές όπου είναι συγκεντρωμένοι χολινεργικοί νευρώνες. Νικοτινικοί και μουσκαρινικοί υποδοχείς της ACh αναγνωρίζονται ως δεσμευτικές και τελεστικές πρωτεΐνες για την διαμεσολάβηση χημικών νευροδιαβιβαστών στους νευρώνες, στα γάγγλια, στην καρδιά και στους λείους μυϊκούς υμένες και τους αδένες. Αυτή η παραδοσιακή οπτική με την AChE να λειτουργεί αποκλειστικά ως νευροδιαβιβαστής πρέπει να αναθεωρηθεί με βάση τα ευρήματα που δημοσιεύτηκαν τον τελευταίο αιώνα, παρουσιάζοντας το μη νευρωνικό χολινεργικό σύστημα.

Η ακετυλοχολινεστεράση (AChE)κωδικοποιείται από ένα μοναδικό γονίδιο AChE, του οποίου η δομική ποικιλομορφία στα προϊόντα του γονιδίου προκύπτει από διαφορετικό μάτισμα του nRNA και μετα-μεταφραστικές ενώσεις των καταλυτικών και δομικών υπομονάδων. Η κύρια μορφή της AChE που βρίσκετε στον εγκέφαλο, τους μύες και σε άλλους ιστούς είναι η υδρόφιλη μορφή, η οποία σχηματίζει συνδεδεμένα με δισουλφιδικούς δεσμούς ολιγομερή με κολλαγονοειδή, λιπιδικές δομικές υπομονάδες. Η άλλη, εναλλακτικά-ματισμένη μορφή, που εκφράζεται κυρίως στους ερυθροειδείς ιστούς, είναι δομικά διαφορετική στο

C-τερματικό άκρο και περιέχει ένα διασπώμενο πεπτίδιο με μία GPI άγκυρα. Σχετίζεται με τους υποδοχείς της μεμβράνης μέσω τμημάτων φωσφοϊνοσιτιδίου, τα οποία προστίθεται μετά-μεταγραφικά. Παρεμπόδιση της χολινεργικής νευροδιαβίβασης λαμβάνει χώρα στη νόσο του Alzheimer, αλλά υπάρχει αντιπαράθεση σχετικά με τη σχετικότητα της στα πρώτα στάδια της νόσου. Χιλιάδες περιπτώσεις οξείας δηλητηρίασης έχουν καταγραφεί. Αυτή η οξεία τοξικότητα αναστέλλει τη λειτουργία της AChE στις νευρικές απολήξεις, όπου η αναστολή προκαλεί τη συσσώρευση της ACh. Αυτό, με τη σειρά του, προκαλεί υπερδιέγερση των νικοτινικών και μουσκαρινικών υποδοχέων στο κεντρικό και στο περιφερικό νευρικό σύστημα και τα επακόλουθα συμπτώματα.

9. Σύμπλοκα του Μαγγανίου

9.1 Τρανσφερίνη

Η τρανσφερρίνη αποτελεί την κυρίαρχη πρωτεΐνη του πλάσματος για τη μεταφορά σιδήρου. Ένα μόριο τρανσφερίνης δεσμεύει δύο ιόντα σιδήρου.

Η τρανσφερίνη συντίθεται στο ήπαρ και σε μικρότερο βαθμό στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα και στους ενδοκρινείς αδένες, όπως οι όρχεις και οι ωοθήκες. Τα επίπεδά της στο πλάσμα ρυθμίζονται κυρίως από τη διαθεσιμότητα σιδήρου. Σε καταστάσεις που συνοδεύονται από έλλειψη σιδήρου τα επίπεδά της στο πλάσμα αυξάνονται, ενώ έπειτα από θεραπεία με σίδηρο επανέρχονται στο φυσιολογικό. Η τρανσφερίνη μεταβολίζεται στα παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος. Περίπου το μισό της εξωκυττάριου τρανσφερίνης βρίσκεται στη λέμφο και στο CSF.Ο σίδηρος που απορροφάται από το έντερο ή που προέρχεται από

αποδόμηση της αιμοσφαιρίνης δεσμεύεται από τρανσφερίνη και μεταφέρεται στις θέσεις αποθήκευσης, όπως το ήπαρ και το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα. Το σύμπλοκο τρανσφερίνης – σιδήρου συνδέεται στον υποδοχέα και όλα μαζί εισέρχονται στο εσωτερικό του κυττάρου μέσα σε ένα ενδοσόμιο καλυπτόμενο από καθεψίνη. Στο εσωτερικό του ενδοσομίου το pH είναι όξινο με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του σιδήρου. Ο ελεύθερος σίδηρος ενσωματώνεται σε φεριτίνη και αιμοσιδηρίνη προκειμένου να χρησιμοποιηθεί στη σύνθεση ουσιών που περιέχουν σίδηρο, όπως η αιμοσφαιρίνη, μυοσφαιρίνη και κυτοχρώματα.

9.2 α_2- μακροσφαιρίνη

Η α_2- μακροσφαιρίνη ανήκει στις α_2 σφαιρίνες που είναι λευκωματίνη και αυξάνουν όταν κινητοποιούνται οξέως οι αμυντικοί μηχανισμοί, όπως σε φλεγμονές, τραύματα και ιστική νέκρωση. Η α_2- μακροσφαιρίνη είναι μια πρωτεϊνη αναστολέας της πλασμίνης και θρυψίνης και έχει την ικανότητα να συνδέεται με την ινσουλίνη. Αποτελεί έναν από τους κυριότερους αναστολείς πρωτεϊνασών πλάσματος. Λόγω του μεγάλου της μεγέθους δεν μπορεί να διαχυθεί έξω από τα αιμοφόρα αγγεία και συνεπώς ανευρίσκεται μόνο στον ενδοαγγειακό χώρο. Η α_2- μακροσφαιρίνη παράγεται, κυρίως, από τα ηπατικά παρεγχυματικά κύτταρα. Ο μεταβολισμός της γίνεται στα ηπατοκύτταρα και εμφανίζει χρόνο ημίσειας ζωής στον όρο 5 ημέρες. Τα επίπεδα της α_2- μακροσφαιρίνης είναι 2-3 φορές υψηλότερα στα βρέφη και στα παιδιά απ' ό,τι στους ενήλικες. Η α_2- μακροσφαιρίνη αποτελεί τον πιο σημαντικό αναστολέα σχεδόν όλων των ενζύμων που διασπούν εσωτερικά τις πρωτεΐνες (ενδοπρωτεάσες).
Η α_2- μακροσφαιρίνη αναστέλλει τη δράση πρωτεϊνων της σερίνης (ελαστάση, κολλαγέναση), πρωτεασών (θεοόλης), μεταλλοπρωτεάσων και καθεφίνης D (καρβοζη -πρωτεάση). Από τη στιγμή που η α_2- μακροσφαιρίνη δεσμευθεί στην πρωτεϊνάση το σύμπλοκο α_2 μακροσφαιρίνη - πρωτεϊνάσων απομακρύνεται άμεσα από την κυκλοφορία δεσμευόμενο σε υποδοχείς που βρίσκονται στα μακροφάγα, ηπατοκύτταρα και ινοβλάστες. Ακόμη, η α_2- μακροσφαιρίνη μεταφέρει μεγάλο αριθμό μικροπεπτιδίων,όπως οι κυτοκινίνες και οι αυξητικοί παράγοντες (ινσουλίνη και αυξητική ορμόνη) και δισθενή κατιόντα, όπως ο ψευδάργυρος. Πιστεύεται, επίσης, ότι η α_2- μακροσφαιρίνη παίζει σημαντικό ρόλο στις ανοσολογικές και φλεγμονώδεις αντιδράσεις.

ΙΙ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

10. Σχεδιασμός πειραμάτων

10.1. Παραλαβή δειγμάτων

Τα δείγματα των πειραμάτων αποτελούνταν από εγκεφαλονωτιαίο υγρό (cerebrospinal fluid), το οποίο προσφέρθηκε από το νευρολογικό τμήμα της Ιατρικής σχολής του Πολυτεχνείου του Μονάχου (Technical University of Munich) από 26 ασθενείς. Οι δότες παρουσίαζαν ανεξήγητες νευρολογικές ενοχλήσεις, όπως πονοκεφάλους, ζάλη και διάφορες ανωμαλίες στις αισθήσεις. Τα δείγματα του εγκεφαλονωτιαίου υγρού συλλέχτηκαν από τον κάθε ασθενή με οσφυονωτιαία παρακέντηση. Μετά από έγκριση των ασθενών για χρήση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού για επιστημονική χρήση τα προηγουμένως κατεψυγμένα δείγματα αποψύχτηκαν στους $4^{o}C$, φυγοκεντρήθηκαν και ήταν έτοιμα για περαιτέρω ανάλυση. Τα δείγματα χωρίζονται σε δύο σειρές δειγμάτων. Την πρώτη με είκοσι δείγματα και την δεύτερη με έξι.

10.2. Ποσοτικός προσδιορισμός ολικού Μαγγανίου και Σιδήρου

Με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας ατομικής εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα ICP-AES (Inductively coupled Plasma – Atomic Emission Spectometry) έγινε ποσοτικός προσδιορισμός του ολικού Μαγγανίου και Σιδήρου στα δείγματα του εγκεφαλονωτιαίου υγρού, έτσι ήταν εφικτός ο προσδιορισμός της ποσότητας του Μαγγανίου στα δείγματα και του της αναλογίας δισθενούς και τρισθενούς Σιδήρου στο κάθε δείγμα.

10.3. Διαχωρισμός – Ειδοταυτοποίηση των ενώσεων των δειγμάτων

Ο διαχωρισμός των διαφόρων συμπλόκων του Μαγγανίου στα δείγματα του εγκεφαλονωτιαίου υγρού πραγματοποιήθηκε με τη χρήση χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους SEC (Size Exclusion Chromatography), η οποία στη συνέχεια συνδέθηκε σε σειρά με τη διάταξη της φασματομετρίας οπτικής εκπομπής επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος ICP-OES (inductively coupled plasma-optical emission spectrometry). Προκειμένου να γίνει η χρήση της στήλης SEC με επιτυχία πραγματοποιήθηκε πρώτα χρωματογραφική έκλουση πρότυπων δειγμάτων, κατά βάση πρωτεϊνών Μαγγανίου και έπειτα χάραξη της καμπύλης βαθμονόμησης.

10.4. Ενεργότητα Βιολογικών Μορίων

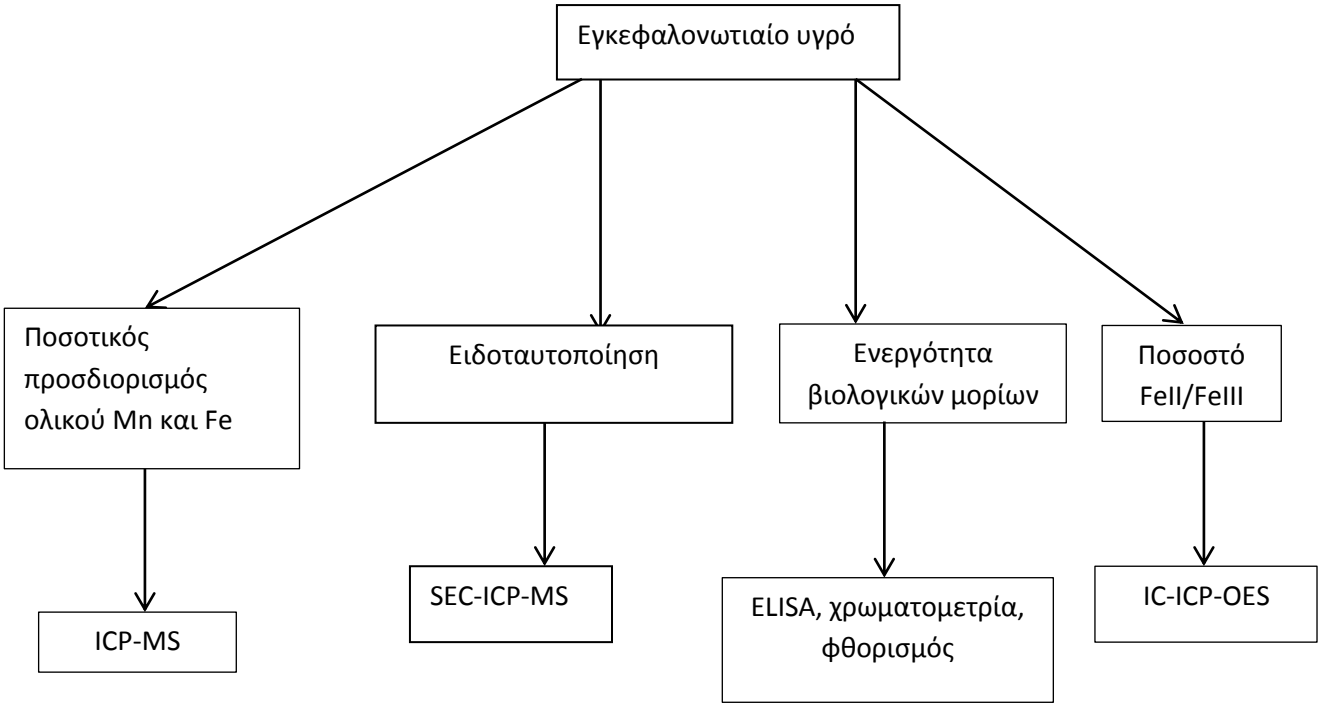
Η ενεργότητα των βιολογικών μορίων γ-αμινοβουτυρικό οξύ (gABA), γλουταμινικό (Glutamate) και ακετυλοχολινεστεράση (AChE) μετρήθηκε με διαφορετικά κιτ προσδιορισμού. Η ενεργότητα του μορίων γ-αμινοβουτυρικό οξέως με το Elisa (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) κιτ προσδιορισμού της εταιρίας USCN. Η ενεργότητα της ακετυλοχολινεστεράσης με το κιτ φθορισμού της εταιρίας Arbor Assays. Τέλος η ενεργότητα του γλουταμινικού με το χρωματομετρικό κιτ της εταιρίας Biovision.

10.5. Αναλογία δισθενούς/τρισθενούς Σιδήρου

Η αναλογία του δισθενούς και του τρισθενούς σιδήρου μετρήθηκε με τη χρήση χρωματογραφίας ιοντοεναλαγής IEC (Ion Exchange Chromatography), η οποία στη συνέχεια συνδέθηκε σε σειρά με τη διάταξη της φασματομετρίας οπτικής εκπομπής επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος ICP-OES (inductively coupled plasma-optical emission spectrometry). Για τον διαχωρισμό του δισθενούς σιδήρου από τον τρισθενή χρησιμοποιήθηκε στήλη Dionex IonPac της Thermo Scientific.

10.6. Συσχέτιση της ενεργότητας των Βιολογικών Μορίων με την συγκέντρωση του Μαγγανίου σε κάθε ένωση

Μετά την ολοκλήρωση των μετρήσεων πραγματοποιήθηκε ανάλυση των αποτελεσμάτων και κατάταξη τους ώστε να ερευνηθεί αν η παρουσία του Μαγγανίου σε κάποια ένωση επηρεάζει την ενεργότητα κάποιου βιολογικού μορίου.



Σχήμα 10-1: Διάγραμμα ροής του πειραματικού μέρους

11. Χημικά αντιδραστήρια- δείγματα

11.1. Δείγματα

Εγκεφαλονωτιαίου υγρό

Τα δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (cerebrospinal fluid), προσφέρθηκαν από το νευρολογικό τμήμα της Ιατρικής σχολής του Πολυτεχνείου του Μονάχου (Technical University of Munich) από 24 ασθενείς. Οι δότες παρουσίαζαν ανεξήγητες νευρολογικές ενοχλήσεις, όπως πονοκεφάλους, ζάλη και διάφορες ανωμαλίες στις αισθήσεις. Τα δείγματα του εγκεφαλονωτιαίου υγρού συλλέχτηκαν από τον κάθε ασθενή με οσφυονωτιαία παρακέντηση. Μετά από έγκριση των ασθενών για χρήση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού για επιστημονική χρήση τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο και ψύχθηκαν στους -20°. Πριν από κάθε ανάλυση αποψύχονταν στους 4°C και φυγοκεντρούνταν. Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δυο σειρές δειγμάτων. Οι κωδικοί αριθμοί της πρώτης σειράς των δειγμάτων είναι 456, 457, 462, 495, 497, 498, 502, 503, 504, 515, 524, 526, 533, 566, 568, 587, 597, 599, 600, 608 και της δεύτερης 311, 358, 505, 514, 519, 540.

11.2. Αντιδραστήρια

11.2.1 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC)

Προετοιμασία στηλών SEC

Πριν από κάθε ομάδα πειραμάτων οι στήλες πληρώνονταν με πληρωτικό υλικό και καθαρίζονταν διεξοδικά ώστε να απομακρυνθούν οποιαδήποτε υπολείμματα θα μπορούσαν να αλλοιώσουν τα αποτελέσματα.

Το υλικό που αποτέλεσε την στερεή φάση ήταν Tokyo Pearl TSK 55 F και TSK HW 40 S και αποκτήθηκαν από την εταιρία Toso Haas (Stuttgart, Germany) και Biobasic 300 από την Thermo Electron. Το υλικό τοποθετήθηκε μέσα στη στήλη με ροή μικρότερη από 4 mL/min.

Τα υπερκαθαρά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν : Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethane)), HNO_3 και HCL της εταιρίας Merck (Darmstadt, Germany), Το απιονισμένο νερό ήταν τύπου 18 MΩ/cm^{-2} (Milli-Q Water, Milipore Corporation).

Πρότυπες ενώσεις

Οι πρότυπες ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την βαθμονόμηση των χρωματογραφικών στηλών ήταν της εταιρίας Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Germany) και ήταν οι εξής : blue dextan 2000 kDA, γ-globulin 150 kDa, Human Serum Albumin (HSA) 66,5 kDa, Lysozyme 14,3 kDa, b-lactoglobuline 36,5 kDa, Metallothionin 7 kDa, Casein 24 kDa, L-Thyroxine 777 Da, Citric acid 192,5 Da και Methionine 149 Da.

11.2.2 Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους σε συνδυασμό με τη μέθοδο Φασματομετρίας Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (SEC-ICP-MS)

Στη συνδυαστική μέθοδο SEC-ICP-MS χρησιμοποιήθηκαν συγχρόνως δυο διαλύματα έκλουσης για καλύτερα αποτελέσματα. Το πρώτο διάλυμα έκλουσης ήταν Tris-HCl 10mM, 10%MeOH, pH=7,4 και το δεύτερο HNO_3 1%V/V. Η χρήση των δύο διαλυμάτων έκλουσης ήταν απαραίτητη καθώς το HNO_3 σε συνδυασμό με το διάλυμα έκλουσης Tris ελαχιστοποιούν τα φαινόμενα προσκόλλησης στις χρωματογραφικές στήλες. Το pH του διαλύματος ορίστηκε στην τιμή 7,4, με κριτήριο ότι προσεγγίζει την τιμή του pH των δειγμάτων. Η παρουσία αλατιού στην κινητή φάση διευκολύνει την έλευση του δείγματος από την στήλη αφού ελαχιστοποιεί τις δευτερογενείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ δείγματος και του υλικού της στήλης. Έτσι κρίθηκε απαραίτητη η χρήση άλατος $MgSO_4$.

11.2.3 Χρωματογραφία Ιοντοεναλλαγής σε συνδυασμό με τη μέθοδο Φασματομετρίας Οπτικής Εκπομπής Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (IC-ICP-OES)

Στη συνδυαστική μέθοδο IC-ICP-OES χρησιμοποιήθηκε διάλυμα έκλουσης NH_4-Ac +H_2O με ροή 0,8 mL/min εναλλασσόμενη αναλογία 2:8 μέχρι 1:0 ώστε να γίνει ο διαχωρισμός.

12. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

12.1. Μέθοδος αποκλεισμού μεγέθους (SEC)

Ο διαχωρισμός με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους έγινε στις ενώσεις του Μαγγανίου στα δείγματα του εγκεφαλονωτιαίου υγρού μέσω ενός Knauer 1100 Smartline αδρανούς συστήματος βαθμίδωσης HPLC συνδεδεμένο με μία ηλεκτρονική βαλβίδα με βρόχο έγχυσης όγκου 100μL, από την εταιρία Perkin Elmer (Rodgau-Jügescheim, Germany). Για τν διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκαν δύο στήλες, η Biobasic 300 (300x8mm ID, Thermo Electron) με εύρος διαχωρισμού 700 Da-5 kDa, σε σειρά συνδεδεμένη με μια στήλη 550x10mm Kronlab πληρωμένη με TSK-HW40S με εύρος διαχωρισμού 100-2000 Da. Αυτός ο συνδυασμός στηλών παρείχε διαχωρισμό των διάφορων πρωτεϊνών μεταφοράς Μαγγανίου μεταξύ τους, από τα κιτρικά ανιόντα αλλά και από το ανόργανο Μαγγάνιο που βρίσκεται στα δείγματα. Η παροχή του διαλύτη έκλουσης ήταν 7.5 mL/min. Ένας ανιχνευτής υπεριώδους ήταν τοποθετημένος μετά την έξοδο της δεύτερης στήλης, ο οποίος μετρούσε την υπεριώδη ακτινοβολία στα 220nm και 280nm.

12.2. Μέθοδος ιοντοεναλλαγής (IEC)

Ο διαχωρισμός με χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής έγινε στις ενώσεις του Μαγγανίου στα δείγματα του εγκεφαλονωτιαίου υγρού μέσω του παραπάνω συστήματος που χρησιμοποιήθηκε στη SEC. Για τον διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε μια στήλη Dionex IonPac (Thermo Electron). Με αυτήν τη στήλη γίνεται διαχωρισμός από τον δισθενή με τν τρισθενή σίδηρο. Η παροχή του διαλύτη έκλουσης ήταν 8 mL/min.

12.3. Μέθοδος Φασματομετρίας Μάζας Επαγωγικά συζευγμένου Πλάσματος (ICP-MS)

Η διάταξη ICP-MS ήταν ELAN DRC II της εταιρίας Perkin Elmer. Αυτό το μοντέλο έχει τη δυνατότητα χρήσης του Dynamic Reaction Cell (DRC). Το DRC μειώνει τις παρεμβολές της μεθόδου κατά συνέπεια προκύπτουν καλύτερα αποτελέσματα. Το αντιδρόν αέριο που χρησιμοποιήθηκε ήταν αμμωνία. Οι συνθήκες λειτουργίας του οργάνου ήταν RF power = 1200W, Plasma gas = Ar 15 L/min, Nebulizer gas = Ar 950mL/min, DRC-gas NH_3 0,55 mL/min, MCA Channels = 1, Dwell time per 1 min (ms) = 500, DRC band pass (q) = 0,45. Χρησιμοποιήθηκε ισότοπο του Μαγγανίου Mn:54,9381 amu.

12.4. Μέθοδος Φασματομετρίας Οπτικής Εκπομπής Επαγωγικά συζευγμένου Πλάσματος (ICP-OES)

Η διάταξη ICP-OES ήταν το μοντέλο ICP-OES «Optima 7300 » της εταιρίας Perkin Elmer. Χρησιμοποιήθηκε ένα ultrasonic nebulizer της εταιρίας Meinhard. Οι συνθήκες λειτουργίας του οργάνου ήταν : Spectral Element Line Mn = 257,610 nm, RF power =1000 W, Plasma gas (Argon) = 15 L/min, Nebulizer gas = 600 mL/min.

12.5. Φασματοφωτόμετρο ανάγνωσης Μικροπλακών

Η ανάγνωση των μικροπλακών που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη της ενεργότητας των βιολογικών μορίων έγινε από το φασματοφωτόμετρο ανάγνωσης μικροπλακών Safire 2 της εταιρίας Tecan (Männedorf, Switzerland), που έχει τη δυνατότητα μέτρησης φωταύγειας, φθορισμού και οπτικής πυκνότητας.

13. Αναλυτική διαδικασία

13.1. Έλεγχος ποιότητας

Όταν διεξάγονται πειράματα ειδοταυτοποίησης σε ανθρώπινα υγρά είναι πιθανό να συμβούν αλλαγές στα είδη λόγω επιμολύνσεων, προβλημάτων αστάθειας των ειδών κατά τη διάρκεια της αναλυτικής διαδικασίας ή και λόγω της δυσκολίας στην αναγνώριση. Για να ξεπεραστούν τα παραπάνω προβλήματα διενεργήθηκαν αρκετές σειρές πειραμάτων. Ακόμη αποφεύχθηκε η επαφή των δειγμάτων με μεταλλικά μέρη ώστε να μην υπάρξουν επιμολύνσεις και άρα αύξηση στο θόρυβο των οργάνων. Οι στήλες της χρωματογραφίας καθαρίζονταν τακτικά. Οι εκτιμήσεις των μοριακών βαρών των ενώσεων και της ενεργότητας των βιολογικών μορίων πραγματοποιούνταν μετά την βαθμονόμηση όλων των στηλών και των κιτ.

13.2. Ολικός προσδιορισμός Μαγγανίου

Ο ολικός προσδιορισμός του Μαγγανίου έγινε με χρήση της διάταξης ICP-MS. Ο προσδιορισμός αυτός ήταν απαραίτητος για την συσχέτιση του ποσοστού του Μαγγανίου που βρίσκεται σε κάθε ένωση και την περεταίρω συσχέτιση με την ενεργότητα των βιολογικών παραγόντων. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ολικής ποσότητας του Μαγγανίου ελήφθη 1mL δείγματος εγκεφαλονωτιαίου υγρού και αραιώθηκε με διάλυμα TRIS-HCL 10mM, pH 7,4 1:5. Για τη μέθοδο έγιναν τρεις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις.

13.3. Διαχωρισμός – Ειδοταυτοποίηση των ενώσεων των δειγμάτων

Ο διαχωρισμός των διαφόρων συμπλόκων του Μαγγανίου στα δείγματα του εγκεφαλονωτιαίου υγρού πραγματοποιήθηκε με τη χρήση χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους SEC (Size Exclusion Chromatography), η οποία στη συνέχεια συνδέθηκε σε σειρά με τη διάταξη της φασματομετρίας μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry). Ανάλογα με τον χρόνο ανάσχεσης του Μαγγανίου συμπεραίνουμε με ποιο σύμπλοκο μεταφέρεται. Συγκεκριμένα για χρόνο ανάσχεσης 25-32 το Μαγγάνιο είναι συνδεδεμένο στην α-2 μακρογλομπουλίνη, , για 42min-46min το Μαγγάνιο είναι συνδεδεμένο στην τρανσφερίνη και για53min-58min το Μαγγάνιο είναι συνδεδεμένο στο κιτρικό.

13.4. Ενεργότητα Βιολογικών Μορίων

13.4.1 Μελέτη ενεργότητας gABA

Για την μελέτη της ενεργότητας του gABA χρησιμοποιήθηκε το ELISA κιτ της Uscn. Το κιτ χρησιμοποιεί μια ανταγωνιστική ενζυμική ανοσοπροσδιοριστική μέθοδο αναστολής για την in vitro ποσοτική μέτρηση του gABA στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Στη μέθοδο αυτή μια μικροπλάκα είναι επικαλυμμένη με ένα μονόκλωνο αντίσωμα εξειδικευμένο στο gABA. Μια ανταγωνιστική αντίδραση αναστολής λαμβάνει χώρα ανάμεσα σε ιχνοθετημένο με βιοτίνη gABA και μη ιχνοθετημένο gABA που βρίσκετε στα δείγματα και τα διαλύματα αναφοράς με το εξειδικευμένο αντίσωμα στο gABA. Μετά την επώαση το μη ιχνοθετημένο συζηγές ξεπλένεται από την μικροπλάκα. Μετά αβιδίνη συζευγμένη σε ραφανιδική

υπεροξειδάση (HRP) προστίθεται σε κάθε πηγάδι και αφήνεται να επωαστεί. Το ποσοστό της δεσμευμένης συζευγμένης HRP είναι αντίστροφος ανάλογο με την συγκέντρωση του gABA στα δείγματα. Μετά την προσθήκη του διαλύματος που περιέχει το υπόστρωμα η ένταση του χρώματος που διαμορφώνεται είναι αντιστρόφως ανάλογη με την συγκέντρωση του gABA στο κάθε δείγμα.

Αρχικά τα υλικά του κιτ αποψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την απόψυξη παρασκευάσθηκαν πέντε διαλύματα αναφοράς και ένα τυφλό για την δημιουργία της καμπύλης αναφοράς. Για την παρασκευή τους έγινε ανασύνθεση του δείγματος αναφοράς με 0,5mL του αραιωτή αναφοράς και παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για δέκα λεπτά αφού ανακινήθηκε. Η συγκέντρωση gABA στο δείγμα αναφοράς που παρασκευάσθηκε είναι 2.000pg/mL. Για την Παρασκευή των υπόλοιπων τεσσάρων δειγμάτων ετοιμάστηκαν τέσσερεις δοκιμαστικοί σωλήνες με 0,6mL πρότυπου διαλύματος αραίωσης αναφοράς και με τις κατάλληλες αραιώσεις παρασκευάστηκαν δείγματα αναφοράς συγκεντρώσεων 666,67 pg/mL, 222,22pg/mL, 74,07 pg/mL και 24,69 pg/mL. Από αυτά και το τυφλό δείγμα αναφοράς το οποίο περιείχε μόνο διάλυμα αραίωσης κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς.

Στη συνέχεια ανασυντέθηκαν οι αραιωτές προσδιορισμού Α και Β με ανάμιξη με απιονισμένο νερό 1:1. Αντίστοιχα ανασυντέθηκαν και τα αντιδραστήρια ανίχνευσης Α και Β. Το διάλυμα έκλουσης 1:30 με απιονισμένο νερό. Σε κάθε κοιλότητα της επικαλυμμένης με αντίσωμα μικροπλάκας τοποθετήθηκαν 50 μL από τα δείγματα του εγκαιφαλονωτιαίου υγρού, τα δείγματα αναφοράς και το τυφλό αντίστοιχα, στο καθένα προστέθηκαν 50 μL από το αντιδραστήριο ανίχνευσης Α και επωάστηκαν για μία ώρα σε θερμοκρασία 37° C. Αφέθηκαν να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου και ανακινηθήκαν μέχρι το διάλυμα να γίνει ομοιόμορφο.

Στη συνέχεια οι κοιλότητες ξεπλύθηκαν με 350 μL διαλύματος έκλουσης και αφέθηκαν σε διηθητικό χαρτί για πέντε λεπτά. Η διαδικασία έκπλησης επαναλήφθηκε τρεις φορές.

Σε κάθε κοιλότητα της πλάκας τοποθετήθηκαν 100 μL από το αντιδραστήριο ανίχνευσης Β και επωάστηκαν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C. Ακολούθησε η διαδικασία έκπλυσης που περιγράφηκε παραπάνω και επαναλήφθηκε πέντε φορές.

Σε κάθε κοιλότητα προστέθηκαν 90μL του διαλύματος που περιέχει το υπόστρωμα και επωάστηκαν για εικοσιπέντε λεπτά σε θερμοκρασία 37°C προστατευόμενα από το φώς. Σε αυτό το βήμα το χρώμα του διαλύματος γίνετε μπλε. Μετά την επώαση προστίθενται 50 μL του διαλύματος που σταματά την αντίδραση και το χρώμα του διαλύματος σε κάθε πηγάδι αλλάζει σε κίτρινο.
Τέλος γίνεται μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 450nm.

13.4.2 Μελέτη ενεργότητας Γλουταμινικού

Για τη μελέτη της ενεργότητας του γλουταμινικού χρησιμοποιήθηκε το κιτ προσδιορισμού για το γλουταμινικό της εταιρίας BioVision. Το κιτ αυτό παρέχει μια ευαίσθητη μέθοδο ανίχνευσης του γλουταμινικού σε μια ποικιλία δειγμάτων. Το ενζυμικό διάλυμα του κιτ αναγνωρίζει το γλουταμινικό ως ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα και οδηγεί σε ανάλογη ανάπτυξη χρώματος. Έτσι η ποσότητα του γλουταμινικού μπορεί εύκολα να μετρηθεί με χρωματομετρική μέθοδο, όπως φασματομετρία σε μήκος κύματος 450 nm.

Αρχικά τα υλικά του κιτ αποψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και οι φιάλες φυγοκεντρίθηκαν. Στη συνέχεια ανασυντέθηκαν το ενζυμικό μίγμα του γλουταμινικού και ο εμφανιστής του κιτ με 220μL και 820μL απιονισμένου νερού αντίστοιχα όπως και το δείγμα αναφοράς του γλουταμινικού (10μL 0,1M Glutamate standard + 990mL assay buffer). Με κατάλληλες διαδοχικές αραιώσεις παρασκευάστηκαν 5 διαλύματα συγκεντρώσεων 2,4,6,8 και 10 nmol/100μL αντίστοιχα τα οποία μαζί με το τυφλό χρησιμοποιήθηκαν για την χάραξη της καμπύλης αναφοράς. Τα δείγματα αραιώθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα και τοποθετήθηκαν στις κοιλότητες της μικροπλάκας στα οποία προστέθηκε και το μίγμα της ενζυμικής αντίδρασης που περιείχε 90 μL ρυθμιστικού διαλύματος, 8 μL εμφανιστή και 2μL του ενζυμικού μίγματος του γλουταμινικού και επωάστηκαν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C προστατευμένα από το φώς. Ακολούθησε μέτρηση οπτικής πυκνότητας στα 450nm.

13.4.3 Μελέτη ενεργότητας AChE

Η μελέτη της ενεργότητας της AChE έγινε με το DetectX κιτ φθορισμού για την AChE της εταιρίας Arbor Assays, το οποίο είναι σχεδιασμένο για την ποσοτική μέτρηση της ενεργότητας της AChE (mU/mL). Η μέθοδος χρησιμοποιεί το ThioStar, ένα παρασκευασμένο μη-φθορίζον μόριο που προσδένεται ομοιοπολικά στη θειόλικό προϊόν που παράγεται από την αντίδραση μεταξύ του υποστρώματος της AChE και της AChE που βρίσκεται στα δείγματα, δίνοντας φθορίζων προϊών μετρούμενο στα 510nm με διέγερση στα 390nm.

Αρχικά τα αυλικά του κιτ αποψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια ανασυντέθηκαν το ρυθμιστικό διάλυμα του κιτ με 1:10 απιονισμένο νερό και το αντιδραστήριο ανίχνευσης Thiostar και το υπόστρωμα της AChE με 700μL ξηρό διμεθυλοσουλφοξείδιο το καθένα. Στη συνέχεια παρασκευάζονται 5 διαλύματα της πρότυπης AChE 6,25, 12,5, 25, 50, και 100 mU/mL με διαδοχικές αραιώσεις και το τυφλό διάλυμα για την χάραξη της καμπύλης αναφοράς.

Στη συνέχεια τα δείγματα αραιώθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα και τοποθετήθηκαν στα πηγάδια της μικροπλάκας στα οποία προστέθηκαν 50μL του μίγματος αντίδρασης και επωάστηκαν για είκοσι λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε μέτρηση φθορισμού στα 510nm με διέγερση στα 370-410nm.

13.5. Αναλογία δισθενούς/τρισθενούς Σιδήρου

Για τον υπολογισμό της αναλογίας δισθενούς και τρισθενούς σιδήρου αρχικά μετρήθηκε η αρχική συγκέντρωση του σιδήρου στα δείγματα με χρήση του οργάνου ICP-OES. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ολικής ποσότητας του σιδήρου ελήφθη 1mL δείγματος εγκεφαλονωτιαίου υγρού και αραιώθηκε με διάλυμα TRIS-HCL 10mM, pH 7,4 1:5. Για τη μέθοδο έγιναν τρεις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις.

Στη συνέχεια έγινε διαχωρισμός του δισθενούς από τον τρισθενή σίδηρο με χρήση της διάταξης IC-ICP-OES, με τη χρωματογραφική στήλη Dionex IonPac της εταιρίας Thermo Scientific. Στη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε βαθμωτή έκλουση της κινητής φάσης, η σύσταση της οποίας παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 13.1. Σύσταση κινητής φάσης χρωματογραφίας Ιοντοεναλλαγής

Χρόνος (min)	NH_4-Ac	H_2O
0-1,5	20%	80%
7,5-7	20%-60%	80%-40%
7-10	60%-40%	40%-0%
10-14	100%	0%
14-16	1005-20%	0%-80%

14. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

14.1. Προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης του Μαγγανίου και Σιδήρου

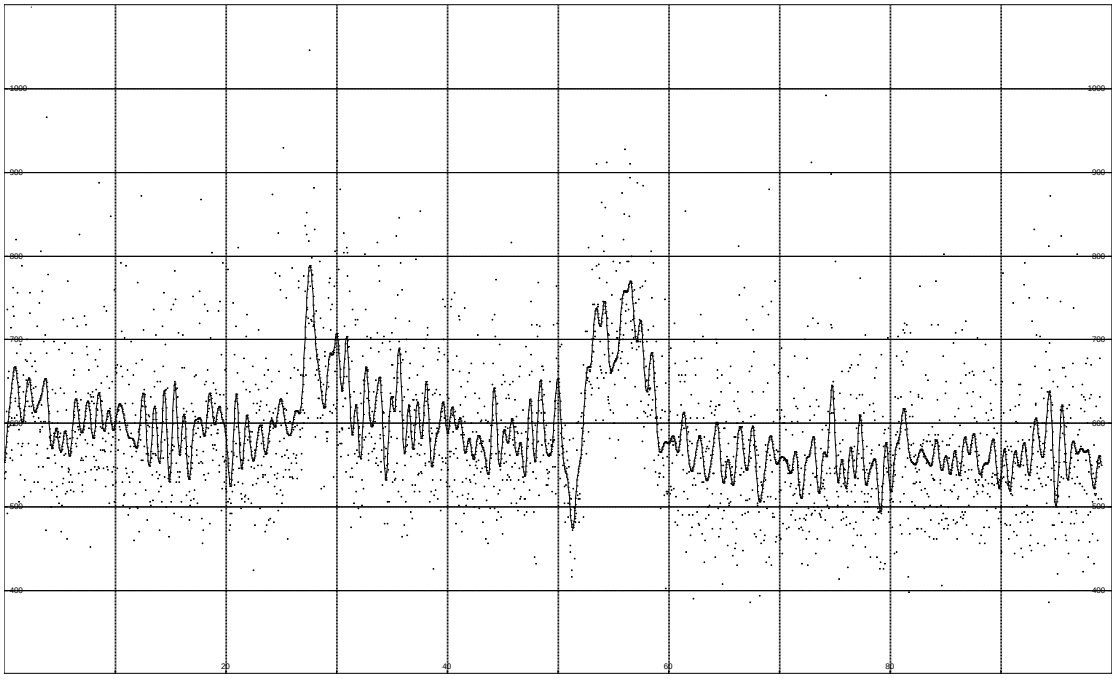
Η μέση συγκέντρωση του Μαγγανίου στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό προσδιορίστηκε στα 511,65 ng/L (n=26 και εύρος 204-1360 ng/L). Αντίστοιχα η μέση συγκέντρωση του Σιδήρου στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό προσδιορίστηκε στα 0,94 mg/L (n=26 και εύρος 0,26-1,29 mg/L). Οι μετρήσεις για κάθε δείγμα παρουσιάζονται στον πίνακα 14.1.

Πίνακας 14.1. Πειραματικές τιμές ολικού Μαγγανίου και Σιδήρου στα δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού.

Αριθμός δείγματος CSF	Ολικό Μαγγάνιο (ng/L)	Ολικός Σίδηρος (mg/L)
311	204	0,314
358	548	1,311
457	457	1,06
462	527	1,02
495	439	1,06
497	589	1,05
498	525	1,07
502	579	1,03
503	419	1,12
504	612	1,06
505	621	0,269
514	739	0
515	487	1,12
519	457	0,671
524	422	1,18
526	408	1,18
533	506	1,18
540	472	1,33
566	444	1,29
568	618	1,2
587	538	1,25
597	1360	1,25
599	712	1,22
600	620	1,28

14.2. Διαχωρισμός – Ειδοταυτοποίηση των ενώσεων των δειγμάτων

Με βάση τους χρόνους ανάσχεσης των χρωματογραφιμάτων για κάθε δείγμα υπολογίζεται η συγκέντρωση του Μαγγανίου που βρίσκεται συνδεδεμένη με τη τρανσφερίνη, το κιτρικό και την α_2-μακροσφαιρίνη. Συνδεδεμένο με την α_2-μακροσφαιρίνη είναι το Μαγγάνιο που εμφανίζεται στα 25-32min με την τρανσφερίνη στα 46min και με τα κιτρικά στα 53-58min. Οι μετρήσεις για κάθε δείγμα παρουσιάζονται στον πίνακα 14.2.



Σχήμα 14.1 Χρωματρογράφημα δείγματος 462.

Πίνακας 14.2. Συγκεντρώσεις του Μαγγανίου σε κάθε μακρομόριο στα δείγματα των δειγμάτων.

Αριθμός δείγματος CSF	Συγκέντρωση Μαγγανίου στα Κιτρικά (ng/L)	Συγκέντρωση Μαγγανίου στην Τρανσφερίνη (ng/L)	Συγκέντρωση Μαγγανίου στην α2-μακροσφαιρίνη (ng/L)
311	118,32	2	51
358	274	217,6	36
514	275,6	228,7	60
505	513,76	146,64	118,56
519	147,4	123,4	0
540	251	147	8
456	31,4	183,7	383,03
457	91,29	83,84	112,94
462	162,52	42	171,77
495	13,09	0	0
497	377,40	0	148,43
498	340,82	0	128,75
502	255,24	0	78,23
503	116,78	80	86,71
504	181,25	140	221,6
515	80,32	0	113,61
524	121,21	0	107,41
526	97,80	0	58,71
535	123,69	0	0
566	133,66	0	161,51
568	212,19	0	227
587	273,83	0	47,42
597	79,82	0	0
599	139,29	213,32	316,44
600	278,77	0	73,66
608	279,14	0	104,06

14.3. Ενεργότητα Βιολογικών Μορίων

14.3.1 gABA

Με την μέτρηση της ενεργότητας του gABA μέσω της προαναφερθείσας μεθόδου υπολογίσαμε την συγκέντρωση του gABA σε κάθε δείγμα (pg/mL). Η μέση ενεργότητα του gABA στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό προσδιορίστηκε στα 37,35pg/mL (n=26 και εύρος 4,47-107,39/mL). Οι μετρήσεις για κάθε δείγμα παρουσιάζονται στον πίνακα 14.3.

Πίνακας 14.3. Ενεργότητα gABA στα δείγματα.

Αριθμός δείγματος CSF	gABA (pg/mL)
311	11,04
358	11,42
514	10,50
505	6,08
519	65,22
540	107,39
456	25,48
457	11,42
462	17,13
495	4,48
497	12,80
498	9,38
502	6,37
503	84,31
504	6,08
515	104,23
524	9,11
526	85,38
535	7,06
566	45,50
568	68,49
587	50,97
597	72,49
599	15,68
600	25,48
608	97,80

14.3.2. Γλουταμινικό

Με την μέτρηση της ενεργότητας του γλουταμινικού (Glutamate) μέσω της προαναφερθείσας μεθόδου υπολογίσαμε την συγκέντρωση του γλουταμινικού σε κάθε δείγμα (nmol/μL). Η μέση συγκέντρωση του γλουταμινικού στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό προσδιορίστηκε στα 0,88 nmol/μL (n=26 και εύρος 0,32-2,12nmol/μL). Οι μετρήσεις για κάθε δείγμα παρουσιάζονται στον πίνακα 14.4.

Πίνακας 14.4. Ενεργότητα γλουταμινικού στα δείγματα της πρώτης σειράς δειγμάτων.

Αριθμός δείγματος CSF	Γλουταμινικό (nmol/μL)
311	0,36
358	0,33
514	0,34
505	0,33
519	1,27
540	0,32
456	0,61
457	0,45
462	0,36
495	0,86
497	1,34
498	1,07
502	1,26
503	1,10
504	0,33
515	1,53
524	1,21
526	0,68
535	0,88
566	2,12
568	0,32
587	0,78
597	1,27
599	0,92
600	1,55
608	1,38

14.3.2. AChE

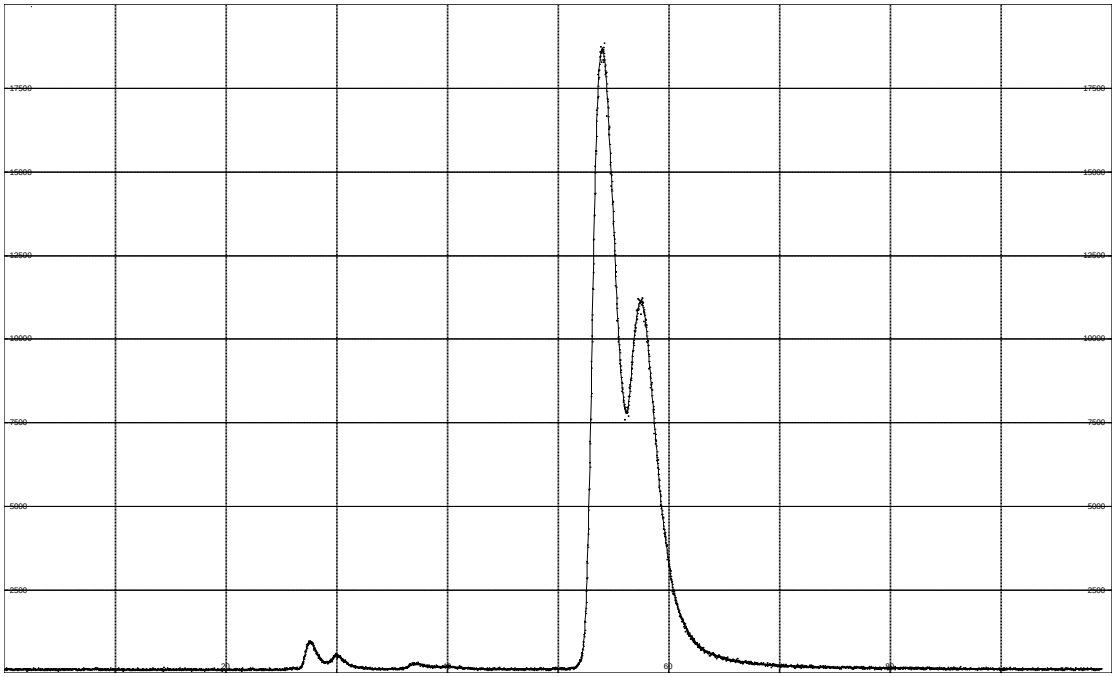
Με την μέτρηση της ενεργότητας της AChE μέσω της προαναφερθείσας μεθόδου υπολογίσαμε την ενεργότητα της AChE σε κάθε δείγμα (mU/mL). Η μέση ενεργότητα της AChE στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό προσδιορίστηκε στα 81,32mU/mL (n=25 και εύρος 6,85-185,288 mU/mL). Οι μετρήσεις για κάθε δείγμα παρουσιάζονται στον πίνακα 14.5.

Πίνακας 14.5. Ενεργότητα AChE στα δείγματα της πρώτης σειράς δειγμάτων.

Αριθμός δείγματος CSF	AChE (mU/mL)
311	49,87
358	0
514	45,00
505	18,70
519	109,78
540	78,20
456	6,85
457	93,32
462	50,50
495	132,62
497	118,87
498	102,14
502	131,02
503	147,18
504	18,70
515	115,69
524	125,17
526	33,32
535	17,51
566	185,29
568	33,11
587	50,83
597	80,85
599	88,08
600	59,64
608	140,92

14.4. Αναλογία δισθενούς / τρισθενούς σιδήρου

Με χρήση της διάταξης IEC-ICP-OES και την περαιτέρω επεξεργασία μέσω του λογισμικού Peakfit μετρήθηκε η συγκέντρωση του δισθενούς και του τρισθενούς σιδήρου στα δείγματα, όπως και η αναλογία τους σε κάθε δείγμα. Η μέση συγκέντρωση του Fe (II) στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό προσδιορίστηκε στα 34,53mg/L (n=22 και εύρος 0,02-104,23mg/L). Για την συγκέντρωση του Fe (III) η μέση τιμή υπολογίστηκε στα 0,04mg/L (n=18 και εύρος 0,01-0,11mg/L). Οι μετρήσεις για κάθε δείγμα παρουσιάζονται στον πίνακα 14.6.



Σχήμα 14.2 Χρωματογράφημα δείγματος 524.

Πίνακας 14.6. Συγκέντρωση FeII , FeII και αναλογία FeII/FeIII στα δείγματα της πρώτης σειράς δειγμάτων.

6	Συγκέντρωση Fe II (mg/L)	Συγκέντρωση Fe III (mg/L)	Αναλογία FeII/FeIII
311		0,03	0
358	0,02		1
514		0,03	0
505		0,01	0
519		0,07	0
540	0,03	0,1	0,233083
456	25,48		1
457	11,42	0,01	0,999326
462	17,13	0,01	0,999562
495	4,48	0,02	0,99646
497	12,8	0,04	0,997117
498	9,38	0,05	0,994184
502	6,37	0,06	0,991383
503	84,31	0,04	0,999574
504	6,08		1
515	104,23		1
524	9,11	0,01	0,998532
526	85,38		1
535	7,06	0,11	0,984941
566	45,5		1
568	68,49	0,01	0,999907
587	50,97		1
597	72,49	0,01	0,999844
599	15,68		1
600	25,48	0,01	0,999423
608	97,8	0,09	1135,93

14.5. Συσχέτιση συγκέντρωσης μεταβολικών μορίων και μεταβολικών ενζυμικών ενεργοτήτων που μπορεί να λειτουργήσουν σαν βιολογικοί δείκτες με συγκεντρώσεις Μαγγανίου και αναλογία μορφών Σιδήρου

Έγινε συσχέτιση των μεταβολικών μορίων και μεταβολικών ενζυμικών ενεργοτήτων όπως της AChE, του gABA και του Glutamate που μπορεί να χρησιμοποιηθούν σαν βιολογικοί δείκτες με τη συγκέντρωση του Μαγγανίου σε κάθε πρωτεϊνικό η μεταβολικό σύμπλοκο όπως είναι η τρανσφερίνη, τα κιτρικά ή η α_2-μακροσφαιρίνη. Ακόμα επιχειρήθηκε η συσχέτιση και με την αναλογία δισθενούς και τρισθενούς σιδήρου στα δείγματα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η διαδικασία αυτή της συσχέτισης βιολογικών μεταβολικών δεικτών και επιβαρυντικών περιβαντολλογικών παραγόντων για την υγεία όπως η συγκέντρωση Mn σε σύμπλοκη μορφή με μεταβολικά μόρια είναι αρκετά δύσκολη μιας και υπάρχει πάντα ο κίνδυνος των λανθασμένων ανθρώπινων δειγμάτων που θεωρήθηκαν ότι «ασθενούν» και που καλύπτονται πολλές φορές από το ιατρικό απόρρητο και τη νομοθεσία που καλύπτει διαδικασίες προσωπικών δεδομένων. Επίσης πρέπει να σημειωθεί ότι αναμένεται η εύρεση μόνο κάποιων θετικών συσχετίσεων από τη πληθώρα πολλών και διαφορετικών πιθανών συνδυασμών που δοκιμάζονται.

Έτσι η οδηγία του επιβλέποντος καθηγητού Berhard Michalke με πολυετή εμπειρία με αυτού του είδους τα πειράματα ήταν να γίνει σχολιασμός μόνο για εκείνες τις πειραματικές διαδικασίες που βρέθηκε συσχέτιση και να μείνουν ασχολίαστα τα μέχρι τώρα φαινομενικώς ασυσχέτιστα αποτελέσματα τα οποία από μόνα τους αποτελούν χρήσιμα δεδομένα για μελλοντική χρησιμοποίηση όταν εμπλουτιστούν με μελλοντικά πειραματικά δεδομένα. Η οδηγία αυτή ακολουθήθηκε.

Η επεξεργασία των μετρήσεων έγινε μέσω του λογισμικού SPSS. Αρχικά έγινε συσχέτιση και των δύο σειρών μετρήσεων μαζί που παρουσιάζονται στον πίνακα 14.7. Και στη συνέχεια για κάθε σειρά δειγμάτων χωριστά, στο πίνακα 14.8 παρουσιάζονται για την πρώτη σειρά μετρήσεων και στον 14.9 για την δεύτερη.

.

Πίνακας 14.7 Συσχετίσεις σε όλα τα δείγματα μαζί.

Correlations		AChE	Γλουταμινικό	gABA	FeII	FeIII
Μαγγάνιο στην α_2-μακροσφαιρίνη	Pearson Correlation	-,129	-,051	-,093	-,468	-,468
	Sig. (2-tailed)	,556	,812	,690	,068	,068
	N	23	24	21	16	16
Μαγγάνιο στα Κιτρικά	Pearson Correlation	-,114	-,111	-,190	,066	,066
	Sig. (2-tailed)	,588	,590	,398	,795	,795
	N	25	26	22	18	18
Μαγγάνιο στην Τρανσφερίνη	Pearson Correlation	-,222	-,013	-,386	,259	,259
	Sig. (2-tailed)	,511	,969	,344	,536	,536
	N	11	12	8	8	8
Ολικό Μαγγάνιο	Pearson Correlation	-,173	,087	,215	-,167	-,167
	Sig. (2-tailed)	,409	,673	,337	,509	,509
	N	25	26	22	18	18

Πίνακας 14.8 Συσχετίσεις στα δείγματα της πρώτης σειράς δειγμάτων.

Correlations		AChE	Γλουταμινικό	gABA	FeII	FeIII
Μαγγάνιο στην α_2-μακροσφαιρίνη	Pearson Correlation	-,311	-,234	-,234	-,391	-,032
	Sig. (2-tailed)	,195	,334	,334	,208	,897
	N	19	19	19	12	19
Μαγγάνιο στα Κιτρικά	Pearson Correlation	,190	-,113	-,113	,268	-,029
	Sig. (2-tailed)	,422	,634	,634	,376	,903
	N	20	20	20	13	20
Μαγγάνιο στην Τρανσφερίνη	Pearson Correlation	,271	-,259	-,259	,423	,669*
	Sig. (2-tailed)	,603	,620	,620	,722	,125
	N	6	6	6	3	6
Ολικό Μαγγάνιο	Pearson Correlation	,518	,145	,145	,044	-,216
	Sig. (2-tailed)	,523	,542	,542	,885	,360
	N	20	20	20	13	20

14.9 Συσχετίσεις στα δείγματα της δεύτερης σειράς δειγμάτων.

Correlations		AChE	Γλουταμινικό	gABA	FeII	FeIII
Μαγγάνιο στην α_2-μακροσφαιρίνη	Pearson Correlation	-,944*	-,518	-,824*	-,467	-,864*
	Sig. (2-tailed)	,016	,292	,042	,350	,046
	N	5	6	6	6	5
Μαγγάνιο στα Κιτρικά	Pearson Correlation	-,693	-,423	-,299	-,019	-,445
	Sig. (2-tailed)	,195	,403	,565	,972	,453
	N	5	6	6	6	5
Μαγγάνιο στην Τρανσφερίνη	Pearson Correlation	-,078	-,147	-,052	,275	,017
	Sig. (2-tailed)	,901	,780	,922	,598	,979
	N	5	6	6	6	5
Ολικό Μαγγάνιο	Pearson Correlation	-,282	-,152	-,172	-,017	-,228
	Sig. (2-tailed)	,645	,774	,744	,975	,712
	N	5	6	6	6	5

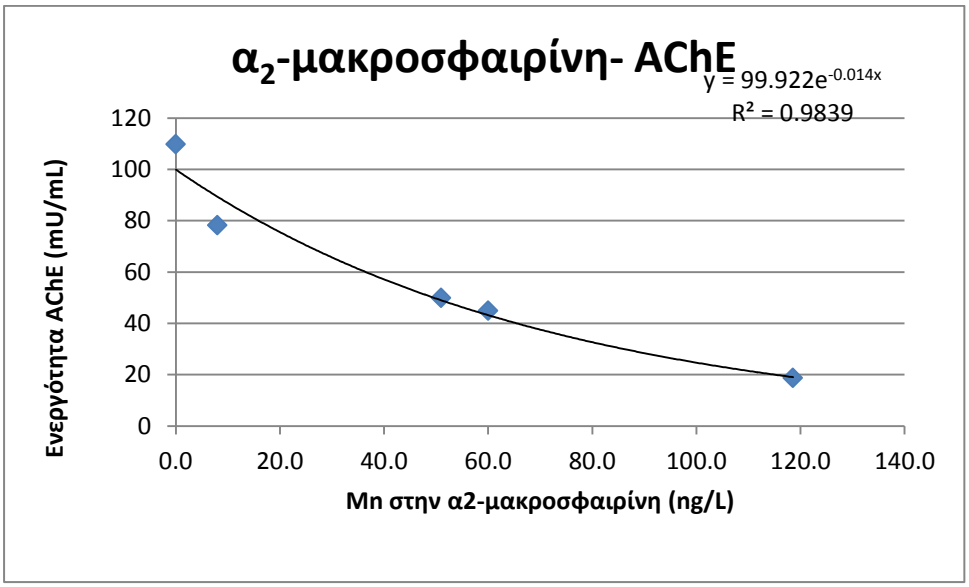
*. Correlation is significant at the 0.05 level.

Παρατηρούμε ότι στην συσχέτιση και των δύο σειρών δειγμάτων μαζί δεν εμφανίζεται κάποια συσχέτιση, όπως και όταν γίνεται συσχέτιση ξεχωριστά της πρώτης σειράς δειγμάτων. Αντίθετα στην δεύτερη σειρά δειγμάτων παρουσιάζονται τρεις συσχετίσεις, **του Μαγγανίου στην α_2-μακροσφαιρίνη με την ενεργότητα της AChE**, όπου συγκεκριμένα εμφανίζεται μια αρνητική συσχέτιση δηλαδή η ενεργότητα της AChE μειώνεται με την αύξηση του Μαγγανίου στην Τρανσφερίνη (R=-0,944 και ρ<0,05), **του Μαγγανίου στην α_2-μακροσφαιρίνη με την ενεργότητα του gABA**, όπου έχουμε αρνητική συσχέτιση (R=-0,824 και ρ<0,05), και **του Μαγγανίου στην α_2-μακροσφαιρίνη με το ποσό του τρισθενούς σιδήρου,** όπου και πάλι εμφανίζεται αρνητική συσχέτιση (R=-0,864 και ρ<0,05). Το γεγονός ότι δεν βρέθηκαν συσχετίσεις συνολικά στις δύο σειρές δειγμάτων και στην πρώτη σειρά δειγμάτων πιθανός οφείλεται στο ότι η πρώτη σειρά δειγμάτων ήταν παλαιότερη από την δεύτερη και καθώς τα δείγματα προέρχονταν από ανθρώπους είχαν επηρεαστεί.

14.5.1. Διαγράμματα με συσχέτιση

Για τις συσχετίσεις που βρέθηκαν κατασκευάστηκαν τα αντίστοιχα διαγράμματα που τις απεικονίζουν.

14.5.1.1. Συσχέτιση συγκέντρωσης Mn που περιέχεται στην α_2-μακροσφαιρίνη και της ενεργότητας της AChE



Σχήμα 14.3 Συσχέτιση Mn α_2-μακροσφαιρίνης με AChE για τη δεύτερη σειρά δειγμάτων.

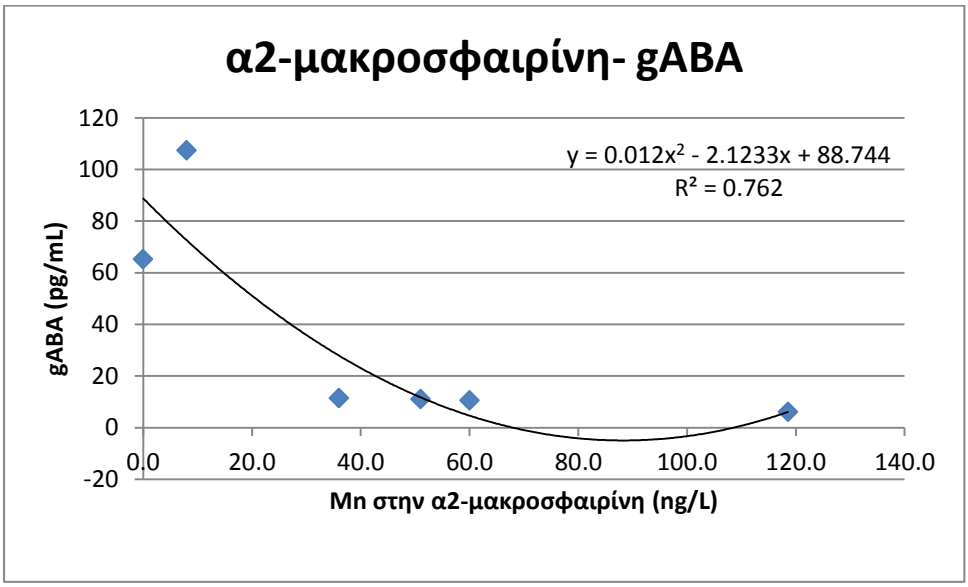
Αύξηση της συγκέντρωσης του μαγγανίου που ήταν συνδεδεμένο με την α_2-μακροσφαιρίνη συσχετίστηκε με μια μείωση στη δραστικότητα της AChE. Το πιο πιθανό είναι η μειωμένη δραστικότητα της AChE να έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μιας σειράς ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών μεταβολικών μονοπατιών που συσσωρεύουν ενδοκυτταρικά ιόντα Ca^{+2} και παράγουν δραστικές μορφές οξυγόνου που οδηγούν σε οξειδωτικό στρες. Έτσι συσχετίζεται άμεσα η έκθεση σε Mn με τη δημιουργία οξειδωτικού στρες μέσω της μείωσης της δραστικότητας της AChE.

Όσον αφορά την έκφραση AChE σε αρουραίους, η κρίσιμη παράμετρος είναι η διάρκεια της έκθεσης σε Mn. Αρκετές μελέτες που αφορούν χαμηλές δόσεις Mn, είχαν σαν αποτέλεσμα μια αύξηση στη δραστικότητα AChE [65] , [68] και [69] , ενώ μια χρόνια έκθεση για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα οδήγησε σε μείωση της δραστηριότητας AChE [66] , [70] και [71] , αντιστοίχως.

Είναι σημαντικό ότι αυτό πλέον επιβεβαιώθηκε για πρώτη φορά στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας και σε δείγματα από ανθρώπους.

Έτσι συμπεραίνουμε ότι η ενεργότητα της AChE μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό βιο-δείκτη εκφυλιστικών νευρολογικών ασθενειών που συσχετίζονται με την συγκέντρωση Mn.

14.5.1.2. Συσχέτιση συγκέντρωσης Mn που περιέχεται στην α_2-μακροσφαιρίνη και της συγκέντρωσης του νευροδιαβιβαστή gABA



Σχήμα 14.4 Συσχέτιση Mn α_2-μακροσφαιρίνης με gABA για τη δεύτερη σειρά δειγμάτων.

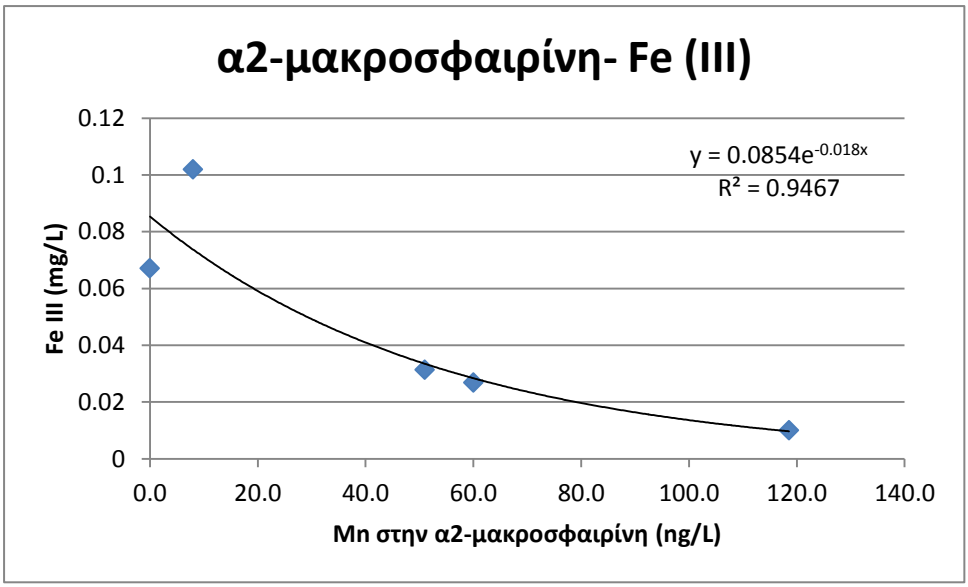
Αύξηση της συγκέντρωσης του μαγγανίου που ήταν συνδεδεμένο με την α_2-μακροσφαιρίνη συσχετίστηκε με μια μείωση στη δραστικότητα gABA.

Το Mn δεν είναι μόνο συμπαράγοντας σημαντικών αντι- οξειδωτικών ενζύμων , αλλά επίσης και ενζύμων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των

νευροδιαβιβαστών [7] . Το gABA είναι ο κύριος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Η επίδραση του Mn στην σύνθεση του νευροδιαβιβαστή GABA συνοψίζεται στην εργασία [72] . Σύμφωνα με αυτήν, υπάρχουν αντικρουόμενα δεδομένα για το κατά πόσον η συσσώρευση Mn οδηγεί σε μειώσεις ή αυξήσεις στα επίπεδα GABA, αλλά είναι αναμφισβήτητο ότι επηρεάζονται τα συστήματα ενεργοποίησης GABA των βασικών γαγγλίων . Μια νεώτερη μελέτη έδειξε μάλιστα , ότι η πρόσληψη Mn από τον εγκέφαλο ήταν αντιστρόφως ανάλογη με την πρόσληψη GABA σε διάστημα 6 εβδομάδων σε αρσενικούς και θηλυκούς αρουραίους [73] . Έχει επίσης αναφερθεί ότι το Μαγγάνιο σχετίζεται με μειώσεις στα επίπεδα του GABA στον εγκέφαλο αρουραίου που συσχετίζονται και με σχετικές νευροχημικές μεταβολές (Erikson et al., 2002).
Είναι σημαντικό ότι αυτή η συσχέτιση πλέον επιβεβαιώθηκε για πρώτη φορά στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας και σε δείγματα από ανθρώπους.

Απ’ότι φαίνεται η συσχέτιση του gABA με το Mn είναι παρόμοια με την δραστικότητα της AChE, δηλαδή το σύστημα ενεργοποίησης gABA φαίνεται να εξαρτάται από την διάρκεια και την συγκέντρωση του παρεχόμενου Mn. Έτσι αναμένεται ότι αφενός μεν το Mn μεταβάλλει τα επίπεδα gABA αλλά επίσης αυτά μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια της έκθεσης σε Mn [76] .

14.5.1.3. Συσχέτιση συγκέντρωσης Mn που περιέχεται στην α_2-μακροσφαιρίνη και της συγκέντρωσης FeIII



Σχήμα 14.5 Συσχέτιση Mn α_2-μακροσφαιρίνης με Fe III για τη δεύτερη σειρά δειγμάτων.

Αύξηση της συγκέντρωσης του μαγγανίου που ήταν συνδεδεμένο με την α_2-μακροσφαιρίνη συσχετίστηκε με μια μείωση στη συγκέντρωση του FeIII. Έχει βρεθεί ότι η ανισορροπία άλλων ειδών μετάλλου , όπως η ισσοροπία του Fe (II) / Fe (III) , μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες. Από την άλλη πλευρά ο σίδηρος είναι σημαντικός για τον μεταβολισμό της ενέργειας, την εμμυέλωση και τη σύνθεση νευροδιαβιβαστών στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Αναγνωρίστηκε ότι η α_2-μακροσφαιρίνη είναι το εξειδικευμένο μόριο πρόσδεσης της εψιδίνης στο αίμα. Η λειτουργία του εψιδίνης είναι η ρύθμιση της διαμεμβρανικής μεταφοράς του σιδήρου και η δέσμευση της οδηγεί σε μείωση της απελευθέρωσης του σιδήρου. (Rao et al., 2013).

15. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα συσχετίστηκαν και οι συντελεστές συσχέτισης υπολογίστηκαν για ερευνηθεί αν υπάρχουν συσχετίσεις μεταξύ συγκεκριμένων Mn συμπλόκων-φορέων και των εξεταζόμενων νευροδιαβιβαστών. Μια ειδική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ της α_2-μακροσφαιρίνης με την συγκέντρωση του FeIII, την ενεργότητα της AChE και το GABA. Αύξηση της συγκέντρωσης του μαγγανίου που ήταν συνδεδεμένη με την α_2-μακροσφαιρίνη συσχετίστηκε με μια μείωση στη δραστικότητα της AChE (Σχήμα 14.3), της συγκέντρωσης του FeIII (Σχήμα 14.5) και του gABA (Σχήμα 14.4) στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Μειωμένη δραστικότητα της AChE, δείχθηκε να σχετίζεται με αυξημένο οξειδωτικό και νιτροζωτικό στρες, επιβεβαιώνοντας άλλες μελέτες σχετικά με την ικανότητα του Μαγγανίου προς την αύξηση του οξειδωτικού στρες. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι η ανασταλτική επίδραση του Μαγγανίου στην δραστικότητα της AChE ενισχύει το οξειδωτικό στρες και τις νευροφλεγμονές στον εγκέφαλο αρουραίου (Santos et al., 2012). Από την άλλη πλευρά ο σίδηρος είναι σημαντικός για τον μεταβολισμό της ενέργειας, την εμμυέλωση και τη σύνθεση νευροδιαβιβαστών στο κεντρικό νευρικό σύστημα.

Αναγνωρίστηκε ότι η α_2-μακροσφαιρίνη είναι το εξειδικευμένο μόριο πρόσδεσης της εψιδίνης στο αίμα. Η λειτουργία του εψιδίνης είναι η ρύθμιση της διαμεμβρανικής μεταφοράς του σιδήρου και η δέσμευση της οδηγεί σε μείωση της απελευθέρωσης του σιδήρου. (Rao et al., 2013).

Το GABA είναι ο κύριος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Έχει αναφερθεί ότι το Μαγγάνιο σχετίζεται με μειώσεις στα επίπεδα του GABA στον εγκέφαλο αρουραίου και με σχετικές νευροχημικές μεταβολές.

16. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

[1] A.W. Dobson, S. Weber, D.C. Dorman, L.K. Lash, K.M. Erikson, M. Aschner, Oxidative stress is induced in the rat brain following repeated inhalation exposure to manganese sulfate, Biol Trace Elem Res, 93 (1–3) (2003), pp. 113–126

[2] M.R. Flynn, P. Susi, Neurological risks associated with manganese exposure from welding operations – a literature review, Int J Hyg Environ Health, 212 (5) (2009), pp. 459–469

[3] R.A. Yokel,Manganese flux across the blood–brain barrier,Neuromol Med, 11 (4) (2009), pp. 297–310

[4] R.G. Lucchini, C.J. Martin, B.C. Doney, From manganism to manganese-induced parkinsonism: a conceptual model based on the evolution of exposure, Neuromol Med, 11 (4) (2009), pp. 311–321

[5] J.L. Aschner, M. Aschner, Nutritional aspects of manganese homeostasis, Mol Aspects Med, 26 (4–5) (2005), pp. 353–362

[6] M. Aschner, K.M. Erikson, E.H. Hernandez, R. Tjalkens, Manganese and its role in Parkinson's disease: from transport to neuropathology, Neuromol Med, 11 (4) (2009), pp. 252–266

[7] M. Aschner, T.R. Guilarte, J.S. Schneider, W. Zheng, Manganese: recent advances in understanding its transport and neurotoxicity, Toxicol Appl Pharmacol, 221 (2) (2007), pp. 131–147

[8] R.A. Yokel, J.S. Crossgrove, Manganese toxicokinetics at the blood–brain barrier, Res Rep Health Eff Inst, 119 (7–58) (2004) [discussion 59–73]

[9]B. Michalke, S. Halbach, V. Nischwitz, Speciation and toxicological relevance of manganese in humans, J Environ Monit, 9 (7) (2007), p. 650

[10] J. Crossgrove, W. Zheng, Manganese toxicity upon overexposure, NMR Biomed, 17 (8) (2004), pp. 544–553

[11] J.E. Post, Manganese oxide minerals: crystal structures and economic and environmental significance, Proc Natl Acad Sci USA, 96 (7) (1999), pp. 3447–3454

[12] EPA Manganese (CASRN 7439-96-5) http://www.epa.gov/iris/subst/0373.htm [26.08.13]. Integrated Risk Information System.

[13] Environmental Protection Agency C, OH, US. Health assessment document for manganese: final report. 1984.

[14] J.C. Meranger, D.C. Smith,The heavy metal content of a typical Canadian diet, Can J Public Health Revue Canadienne de Sante Publique, 63 (1) (1972), pp. 53–57

[15] X.G. Kondakis, N. Makris, M. Leotsinidis, M. Prinou, T. Papapetropoulos, Possible health effects of high manganese concentration in drinking water, Arch Environ Health, 44 (3) (1989), pp. 175–178

[16] Woolf, R. Wright, C. Amarasiriwardena, D. Bellinger, A child with chronic manganese exposure from drinking water, Environ Health Perspect, 110 (6) (2002), pp. 613–616

[17] M. Bouchard, F. Laforest, L. Vandelac, D. Bellinger, D. Mergler, Hair manganese and hyperactive behaviors: pilot study of school-age children exposed through tap water, Environ Health Perspect, 115 (1) (2007), pp. 122–127

[18] T. Roychowdhury, H. Tokunaga, M. Ando, Survey of arsenic and other heavy metals in food composites and drinking water and estimation of dietary intake by the villagers from an arsenic-affected area of West Bengal, India, Sci Total Environ, 308 (1–3) (2003), pp. 15–35

[19] S.H. Frisbie, R. Ortega, D.M. Maynard, B. Sarkar, The concentrations of arsenic and other toxic elements in Bangladesh's drinking water, Environ Health Perspect, 110 (11) (2002), pp. 1147–1153

[20] WHO, Guidelines for drinking-water quality. Vol. 2. Health criteria and other supporting information (2nd ed.)World Health Organization, Geneva (1996)

[21] D.C. Dorman, M.F. Struve, R.A. James, B.E. McManus, M.W. Marshall, B.A. Wong, Influence of dietary manganese on the pharmacokinetics of inhaled manganese sulfate in male CD rats, Toxicol Sci, 60 (2) (2001), pp. 242–251

[22] D.C. Dorman, M.F. Struve, B.A. Wong, Brain manganese concentrations in rats following manganese tetroxide inhalation are unaffected by dietary manganese intake, Neurotoxicology, 23 (2) (2002), pp. 185–195

[23] S. Zoni, G. Bonetti, R. Lucchini, Olfactory functions at the intersection between environmental exposure to manganese and Parkinsonism, J Trace Elem Med Biol, 26 (2–3) (2012), pp. 179–182

[24] J.D. Wang, C.C. Huang, Y.H. Hwang, J.R. Chiang, J.M. Lin, J.S. Chen, Manganese induced parkinsonism: an outbreak due to an unrepaired ventilation control system in a ferromanganese smelter, Br J Ind Med, 46 (12) (1989), pp. 856–859

[25] G. Kenangil, S. Ertan, I. Sayilir, S. Ozekmekci, Progressive motor syndrome in a welder with pallidal T1 hyperintensity on MRI: a two-year follow-up, Mov Disord, 21 (12) (2006), pp. 2197–2200

[26] ACGIH®. TLVs® and BEIs®. ISBN: 978-1-882417-95-7; 2009

[27] Nong, J.G. Teeguarden, H.J. Clewell 3rd, D.C. Dorman, M.E. Andersen, Pharmacokinetic modeling of manganese in the rat IV: assessing factors that contribute to brain accumulation during inhalation exposure, J Toxicol Environ Health Part A, 71 (7) (2008), pp. 413–426

[28] H. Frumkin, G. Solomon, Manganese in the U.S. gasoline supply, Am J Ind Med, 31 (1) (1997), pp. 107–115

[29] M. Baldwin, D. Mergler, F. Larribe, S. Belanger, R. Tardif, L. Bilodeau, K. Hudnell, Bioindicator and exposure data for a population based study of manganese, Neurotoxicology, 20 (2–3) (1999), pp. 343–353

[30] H.K. Hudnell, Effects from environmental Mn exposures: a review of the evidence from non-occupational exposure studies, Neurotoxicology, 20 (2–3) (1999), pp. 379–397

[31] J. Kaiser, Manganese: a high-octane dispute, Science, 300 (5621) (2003), pp. 926–928

[32] K. Sikk, P. Taba, S. Haldre, J. Bergquist, D. Nyholm, G. Zjablov, T. Asser, S.M. Aquilonius, Irreversible motor impairment in young addicts – ephedrone, manganism or both?, Acta Neurol Scand, 115 (6) (2007), pp. 385–389

[33] H.B. Ferraz, P.H. Bertolucci, J.S. Pereira, J.G. Lima, L.A. Andrade, Chronic exposure to the fungicide maneb may produce symptoms and signs of CNS manganese intoxication, Neurology, 38 (4) (1988), pp. 550–553

[34] R. Lucchini, N. Zimmerman, Lifetime cumulative exposure as a threat for neurodegeneration: need for prevention strategies on a global scale, Neurotoxicology, 30 (6) (2009), pp. 1144–1148

[35] D. Stastny, R.S. Vogel, M.F. Picciano, Manganese intake and serum manganese concentration of human milk-fed and formula-fed infants, Am J Clin Nutr, 39 (6) (1984), pp. 872–878

[36] P. Zatta, R. Lucchini, S.J. van Rensburg, A. Taylor, The role of metals in neurodegenerative processes: aluminum, manganese, and zinc, Brain Res Bull, 62 (1) (2003), pp. 15–28

[37] R.G. Lucchini, E. Albini, L. Benedetti, S. Borghesi, R. Coccaglio, E.C. Malara, G. Parrinello, S. Garattini, S. Resola, L. Alessio, High prevalence of Parkinsonian

disorders associated to manganese exposure in the vicinities of ferroalloy industries, Am J Ind Med, 50 (11) (2007), pp. 788–800

[38] B.A. Racette, L. McGee-Minnich, S.M. Moerlein, J.W. Mink, T.O. Videen, J.S. Perlmutter, Welding-related parkinsonism: clinical features, treatment, and pathophysiology, Neurology, 56 (1) (2001), pp. 8–13

[39] Zacco, S. Resola, R. Lucchini, E. Albini, N. Zimmerman, S. Guazzetti, E. Bontempi, Analysis of settled dust with X-ray fluorescence for exposure assessment of metals in the province of Brescia, Italy, J Environ Monit, 11 (9) (2009), pp. 1579–1585

[40] R. Squitti, G. Gorgone, V. Panetta, R. Lucchini, S. Bucossi, E. Albini, L. Alessio, A. Alberici, J.M. Melgari, L. Benussi, G. Binetti, P.M. Rossini, F. Draicchio, Implications of metal exposure and liver function in Parkinsonian patients resident in the vicinities of ferroalloy plants, J Neural Transm, 116 (10) (2009), pp. 1281–1287

[41] M.M. Finkelstein, M. Jerrett, A study of the relationships between Parkinson's disease and markers of traffic-derived and environmental manganese air pollution in two Canadian cities, Environ Res, 104 (3) (2007), pp. 420–432

[42] R.G. Lucchini, S. Guazzetti, S. Zoni, F. Donna, S. Peter, A. Zacco, M. Salmistraro, E. Bontempi, N.J. Zimmerman, D.R. Smith, Tremor, olfactory and motor changes in Italian adolescents exposed to historical ferro-manganese emission, Neurotoxicology, 33 (4) (2012), pp. 687–696

[43] R.G. Lucchini, S. Zoni, S. Guazzetti, E. Bontempi, S. Micheletti, K. Broberg, G. Parrinello, D.R. Smith, Inverse association of intellectual function with very low blood lead but not with manganese exposure in Italian adolescents, Environ Res, 118 (2012), pp. 65–71

[44] M.F. Bouchard, S. Sauve, B. Barbeau, M. Legrand, M.E. Brodeur, T. Bouffard, E. Limoges, D.C. Bellinger, D. Mergler, Intellectual impairment in school-age children exposed to manganese from drinking water, Environ Health Perspect, 119 (1) (2011), pp. 138–143

[45] A.R. Zota, A.S. Ettinger, M. Bouchard, C.J. Amarasiriwardena, J. Schwartz, H. Hu, R.O. Wright, Maternal blood manganese levels and infant birth weight, Epidemiology, 20 (3) (2009), pp. 367–373

[46] H.A. Roels, R.M. Bowler, Y. Kim, B.C. Henn, D. Mergler, P. Hoet, V.V. Gocheva, D.C. Bellinger, R.O. Wright, M.G. Harris, Y. Chang, M.F. Bouchard, H. Riojas-Rodriguez, J.A. Menezes, M.M. Tellez-Rojo, Manganese exposure and

cognitive deficits: a growing concern for manganese neurotoxicity, Neurotoxicology, 33 (4) (2012), pp. 872–880

[47] K.S. Ljung, M.J. Kippler, W. Goessler, G.M. Grander, B.M. Nermell, M.E. Vahter, Maternal and early life exposure to manganese in rural Bangladesh, Environ Sci Technol, 43 (7) (2009), pp. 2595–2601

[48] B.K. Barlow, D.A. Cory-Slechta, E.K. Richfield, M. Thiruchelvam, The gestational environment and Parkinson's disease: evidence for neurodevelopmental origins of a neurodegenerative disorder, Reprod Toxicol, 23 (3) (2007), pp. 457–470

[49] B.C. Henn, L. Schnaas, A.S. Ettinger, J. Schwartz, H. Lamadrid-Figueroa, M. Hernandez-Avila, C. Amarasiriwardena, H. Hu, D.C. Bellinger, R.O. Wright, M.M. Tellez-Rojo, Associations of early childhood manganese and lead coexposure with neurodevelopment, Environ Health Perspect, 120 (1) (2012), pp. 126–131

[50] M. Bouchard, D. Mergler, M. Baldwin, M. Panisset, H.A. Roels, Neuropsychiatric symptoms and past manganese exposure in a ferro-alloy plant, Neurotoxicology, 28 (2) (2007), pp. 290–297

[51] D.S. Rohlman, R. Lucchini, W.K. Anger, D.C. Bellinger, C. van Thriel, Neurobehavioral testing in human risk assessment, Neurotoxicology, 29 (3) (2008), pp. 556–567

[52] J. Couper, Sur les effets du peroxide de manganèse, J Chim Méd Pharm Toxicol, 3 (1837), pp. 223–225

[53] Weiss, Economic implications of manganese neurotoxicity, Neurotoxicology, 27 (3) (2006), pp. 362–368

[54] K.A. Josephs, J.E. Ahlskog, K.J. Klos, N. Kumar, R.D. Fealey, M.R. Trenerry, C.T. Cowl, Neurologic manifestations in welders with pallidal MRI T1 hyperintensity, Neurology, 64 (12) (2005), pp. 2033–2039

[55] J. Bornhorst, C.A. Wehe, S. Huwel, U. Karst, H-J. Galla, T. Schwerdtle, Impact of manganese on and transfer across blood–brain and blood–cerebrospinal fluid barrier in vitro, J Biol Chem, 287 (21) (2012), pp. 17140–17151

[56] A.B. Bowman, G.F. Kwakye, E.H. Hernandez, M. Aschner, Role of manganese in neurodegenerative diseases, J Trace Elem Med Bio, 25 (4) (2011), pp. 191–203

[57] V. Nischwitz, A. Berthele, B. Michalke, Speciation analysis of selected metals and determination of their total contents in paired serum and cerebrospinal fluid samples: an approach to investigate the permeability of the human blood–cerebrospinal fluid-barrier, Anal Chim Acta, 627 (2) (2008), pp. 258–269

[58] Au, A. Benedetto, M. Aschner, Manganese transport in eukaryotes: the role of DMT1, Neurotoxicology, 29 (4) (2008), pp. 569–576

[59] X. Wang, G.J. Li, W. Zheng, Upregulation of DMT1 expression in choroidal epithelia of the blood–CSF barrier following manganese exposure in vitro, Brain Res, 1097 (1) (2006), pp. 1–10

[60] J.S. Crossgrove, R.A. Yokel, Manganese distribution across the blood–brain barrier III. The divalent metal transporter-1 is not the major mechanism mediating brain manganese uptake, Neurotoxicology, 25 (3) (2004), pp. 451–460

[61] X. Wang, D.S. Miller, W. Zheng, Intracellular localization and subsequent redistribution of metal transporters in a rat choroid plexus model following exposure to manganese or iron, Toxicol Appl Pharmacol, 230 (2) (2008), pp. 167–174

[62] A.D. Gitler, A. Chesi, M.L. Geddie, K.E. Strathearn, S. Hamamichi, K.J. Hill, K.A. Caldwell, G.A. Caldwell, A.A. Cooper, J.C. Rochet, S. Lindquist, Alpha-synuclein is part of a diverse and highly conserved interaction network that includes PARK9 and manganese toxicity, Nat Genet, 41 (3) (2009), pp. 308–315

[63] T. Jursa, D.R. Smith, Ceruloplasmin alters the tissue disposition and neurotoxicity of manganese, but not its loading onto transferrin,Toxicol Sci, 107 (1) (2009), pp. 182–193

[64] W.C. Stallings, A.L. Metzger, K.A. Pattridge, J.A. Fee, M.L. Ludwig, Structure–function relationships in iron and manganese superoxide dismutases, Free Radic Res Commun, 1 (1991), pp. 2–13 Pt 1:259–268

[65] Y. Chtourou, K. Trabelsi, H. Fetoui, G. Mkannez, H. Kallel, N. Zeghal, Manganese induces oxidative stress, redox state unbalance and disrupts membrane bound ATPases on murine neuroblastoma cells in vitro: protective role of silymarin, Neurochem Res, 36 (8) (2011), pp. 1546–1557

[66] Santos, D. Milatovic, V. Andrade, M.C. Batoreu, M. Aschner, A.P. Marreilha dos Santos, The inhibitory effect of manganese on acetylcholinesterase activity enhances oxidative stress and neuroinflammation in the rat brain, Toxicology, 292 (2–3) (2012), pp. 90–98

[67] Milatovic, R.C. Gupta, Y.C. Yu, S. Zaja-Milatovic, M. Aschner, Protective effects of antioxidants and anti-inflammatory agents against manganese-induced oxidative damage and neuronal injury, Toxicol Appl Pharmacol, 256 (3) (2011), pp. 219–226

[68] Liapi, A. Zarros, P. Galanopoulou, S. Theocharis, N. Skandali, H. Al-Humadi, F. Anifantaki, E. Gkrouzman, Z. Mellios, S. Tsakiris, Effects of short-term exposure to manganese on the adult rat brain antioxidant status and the

activities of acetylcholinesterase, (Na,K)-ATPase and Mg-ATPase: modulation by L-cysteine, Basic Clin Pharmacol Toxicol, 103 (2) (2008), pp. 171–175

[69] M.A. Lebda, M.S. El-Neweshy, Y.S. El-Sayed, Neurohepatic toxicity of subacute manganese chloride exposure and potential chemoprotective effects of lycopene, Neurotoxicology, 33 (1) (2012), pp. 98–104

[70] J.C. Lai, T.K. Leung, L. Lim, Differences in the neurotoxic effects of manganese during development and aging: some observations on brain regional neurotransmitter and non-neurotransmitter metabolism in a developmental rat model of chronic manganese encephalopathy, Neurotoxicology, 5 (1) (1984), pp. 37–47

[71] H. Martinez, E. Bonilla, Water intake and brain choline-acetyltransferase and acetylcholinesterase activities in manganese treated rats, Neurobehav Toxicol Teratol, 3 (3) (1981), pp. 277–280

[72] V.A. Fitsanakis, C. Au, K.M. Erikson, M. Aschner, The effects of manganese on glutamate, dopamine and gamma-aminobutyric acid regulation, Neurochem Int, 48 (6–7) (2006), pp. 426–433

[73] J.G. Anderson, P.T. Cooney, K.M. Erikson, Brain manganese accumulation is inversely related to gamma-amino butyric acid uptake in male and female rats, Toxicol Sci, 95 (1) (2007), pp. 188–195

[74] J.G. Anderson, S.C. Fordahl, P.T. Cooney, T.L. Weaver, C.L. Colyer, K.M. Erikson, Manganese exposure alters extracellular GABA, GABA receptor and transporter protein and mRNA levels in the developing rat brain, Neurotoxicology, 29 (6) (2008), pp. 1044–1053

[75] D.R. Crooks, N. Welch, D.R. Smith, Low-level manganese exposure alters glutamate metabolism in GABAergic AF5 cells, Neurotoxicology, 28 (3) (2007), pp. 548–554

[76] Santos, M.C. Batoreu, I. Almeida, R. Ramos, M. Sidoryk-Wegrzynowicz, M. Aschner, A.P. Marreilha Dos Santos, Manganese alters rat brain amino acids levels, Biol Trace Elem Res, 150 (1–3) (2012), pp. 337–341

[77] M.K. Chen, J.S. Lee, J.L. McGlothan, E. Furukawa, R.J. Adams, M. Alexander, D.F. Wong, T.R. Guilarte, Acute manganese administration alters dopamine transporter levels in the non-human primate striatum, Neurotoxicology, 27 (2) (2006), pp. 229–236

[78] T.R. Guilarte, M.K. Chen, J.L. McGlothan, T. Verina, D.F. Wong, Y. Zhou, M. Alexander, C.A. Rohde, T. Syversen, E. Decamp, A.J. Koser, S. Fritz, H. Gonczi, D.W. Anderson, J.S. Schneider, Nigrostriatal dopamine system dysfunction and

subtle motor deficits in manganese-exposed non-human primates, Exp Neurol, 202 (2) (2006), pp. 381–390

[79] Zhao, T. Cai, M. Liu, G. Zheng, W. Luo, J. Chen, Manganese induces dopaminergic neurodegeneration via microglial activation in a rat model of manganism, Toxicol Sci, 107 (1) (2008), pp. 156–164

[80] J. Bornhorst, F. Ebert, A. Hartwig, B. Michalke, T. Schwerdtle, Manganese inhibits poly(ADP-ribosyl)ation in human cells: a possible mechanism behind manganese-induced toxicity?, J Environ Monit, 12 (11) (2010), p. 2062

[81] J. Bornhorst, S. Meyer, T. Weber, C. Boker, T. Marschall, A. Mangerich, S. Beneke, A. Burkle, T. Schwerdtle, Molecular mechanisms of Mn induced neurotoxicity: RONS generation, genotoxicity, and DNA-damage response, Mol Nutr Food Res, 57 (7) (2013), pp. 1255–1269

[82] P.D. Lima, M.C. Vasconcellos, M.O. Bahia, R.C. Montenegro, C.O. Pessoa, L.V. Costa-Lotufo, M.O. Moraes, R.R. Burbano, Genotoxic and cytotoxic effects of manganese chloride in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle, Toxicol In Vitro, 22 (4) (2008), pp. 1032–1037

[83] J. Bornhorst, F. Ebert, H. Lohren, H.U. Humpf, U. Karst, T. Schwerdtle, Effects of manganese and arsenic species on the level of energy related nucleotides in human cells, Metallomics: Integr Biomet Sci, 4 (3) (2012), pp. 297–306

[84] R.B. Hernandez, M. Farina, B.P. Esposito, N.C. Souza-Pinto, F. Barbosa Jr., C. Sunol, Mechanisms of manganese-induced neurotoxicity in primary neuronal cultures: the role of manganese speciation and cell type, Toxicol Sci, 124 (2) (2011), pp. 414–423

[85] J.A. Roth, Are there common biochemical and molecular mechanisms controlling manganism and parkinsonism, Neuromol Med, 11 (4) (2009), pp. 281–296

[86] Y. Higashi, M. Asanuma, I. Miyazaki, N. Hattori, Y. Mizuno, N. Ogawa, Parkin attenuates manganese-induced dopaminergic cell death, J Neurochem, 89 (6) (2004), pp. 1490–1497

[87] Rentschler, L. Covolo, A.A. Haddad, R.G. Lucchini, S. Zoni, K. Broberg, ATP13A2 (PARK9) polymorphisms influence the neurotoxic effects of manganese, Neurotoxicology, 33 (4) (2012), pp. 697–702

[88] M. Masuda, M. Braun-Sommargren, D. Crooks, D.R. Smith, Golgi phosphoprotein 4 (GPP130) is a sensitive and selective cellular target of manganese exposure, Synapse, 67 (5) (2012), pp. 205–215

[89] J. Cawte, G. Hams, C. Kilburn, Manganism in a neurological ethnic complex in northern Australia, Lancet, 329 (8544) (1987), p. 1257

[90] D.M. Templeton, F. Ariese, R. Cornelis, L.G. Danielsson, H. Muntau, H.P. Van Leeuwen, R. Lobinski, Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000)

[91] Michalke, Manganese speciation using capillary electrophoresis – ICP-mass spectrometry, J Chromatogr A, 1050 (1) (2004), pp. 69–76

[92] Michalke, A. Berthele, P. Mistriotis, M. Ochsenkuhn-Petropoulou, S. Halbach, Manganese speciation in human cerebrospinal fluid using CZE coupled to inductively coupled plasma MS, Electrophoresis, 28 (9) (2007), pp. 1380–1386

[93] J.S. Crossgrove, D.D. Allen, B.L. Bukaveckas, S.S. Rhineheimer, R.A. Yokel, Manganese distribution across the blood–brain barrier, I. Evidence for carrier-mediated influx of managanese citrate as well as manganese and manganese transferrin, Neurotoxicology, 24 (1) (2003), pp. 3–13

[94] J. Diederich, M. Brielmeier, T. Schwerdtle, B. Michalke, Manganese and iron species in Sprague-Dawley rats exposed with MnCl2 center dot 4H(2)O (i.v.), Microchem J, 105 (2012), pp. 115–123

[95] B. Michalke, M. Lucio, A. Berthele, B. Kanawati, Manganese speciation in paired serum and CSF samples using SEC-DRC-ICP-MS and CE-ICP-DRC-MS, Anal Bioanal Chem, 405 (7) (2013), pp. 2301–2309

[96] V. Nischwitz, B. Michalke, Electrospray ionisation with selected reaction monitoring for the determination of Mn-citrate, Fe-citrate, Cu-citrate and Zn-citrate, Rapid Commun Mass Spectrom, 23 (15) (2009), pp. 2338–2346

[97] Smith, R. Gwiazda, R. Bowler, H. Roels, R. Park, C. Taicher, R. Lucchini, Biomarkers of Mn exposure in humans, Am J Ind Med, 50 (11) (2007), pp. 801–811

[98] P. Hoet, E. Vanmarcke, T. Geens, G. Deumer, V. Haufroid, H.A. Roels, Manganese in plasma: a promising biomarker of exposure to Mn in welders. A pilot study, Toxicol Lett, 213 (1) (2012), pp. 69–74

[99] L. Lu, L.L. Zhang, G.J. Li, W. Guo, W. Liang, W. Zheng, Alteration of serum concentrations of manganese, iron, ferritin, and transferrin receptor following exposure to welding fumes among career welders, Neurotoxicology, 26 (2) (2005), pp. 257–265

[100] R.O. Wright, C. Amarasiriwardena, A.D. Woolf, R. Jim, D.C. Bellinger, Neuropsychological correlates of hair arsenic, manganese, and cadmium levels

in school-age children residing near a hazardous waste site, Neurotoxicology, 27 (2) (2006), pp. 210–216

[101] R. Eastman, T. Jursa, C. Benedetti, R. Lucchini, D. Smith, Hair as a biomarker of environmental manganese exposure, Environ Sci Technol, 47 (3) (2012), pp. 1629–1637

[102] Y.M. Jiang, W. Zheng, L.L. Long, W.J. Zhao, X.R. Li, X.A. Mo, J.P. Lu, X. Fu, W.M. Li, S.T. Liu, Q.Y. Long, J.L. Huang, E. Pira, Brain magnetic resonance imaging and manganese concentrations in red blood cells of smelting workers: search for biomarkers of manganese exposure, Neurotoxicology, 28 (1) (2007), pp. 126–135

[103] D.M. Cowan, Q.Y. Fan, Y. Zou, X.J. Shi, J. Chen, M. Aschner, F.S. Rosenthal, W. Zheng, Manganese exposure among smelting workers: blood manganese-iron ratio as a novel tool for manganese exposure assessment, Biomarkers, 14 (1) (2009), pp. 3–16

[104] D.M. Cowan, W. Zheng, Y. Zou, X.J. Shi, J. Chen, F.S. Rosenthal, Q.Y. Fan, Manganese exposure among smelting workers: relationship between blood manganese-iron ratio and early onset neurobehavioral alterations, Neurotoxicology, 30 (6) (2009), pp. 1214–1222

[105] V. Nischwitz, A. Berthele, B. Michalke, Rapid size fractionation of metal species in paired human serum and cerebrospinal fluid samples using ultrafiltration with off-line element selective detection, J Anal At Spectrom, 25 (7) (2010), pp. 1130–1137