



ΤΟΜΕΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

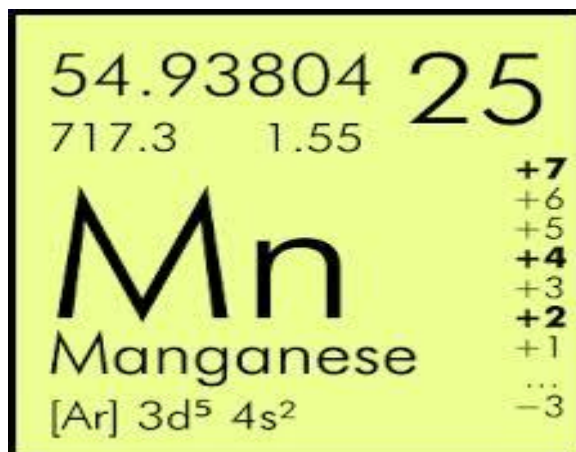
ΕΙΔΟΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΗ
ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ HPLC-ICP-MS

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΣΛΑΝΟΓΛΟΥ ΛΕΩΝΙΔΑΣ

ΑΝΑΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΒΛΕΨΗ:

Μ. ΟΞΕΝΚΙΟΥΝ-ΠΕΤΡΟΠΟΥΛΟΥ, Καθ. ΕΜΠ



ΑΘΗΝΑ

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2015

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT	6
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	7
1.ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ.....	8
1.1. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	8
1.2 ΡΟΛΟΣ ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ.....	16
1.2.1 ΤΟ ΜΑΓΓΑΝΙΟ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	16
1.2.2 ΤΟ ΜΑΓΓΑΝΙΟ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ	17
1.2.3 ΕΠΙΠΕΔΑ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ	18
1.3 ΜΑΓΓΑΝΙΟ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ.....	21
1.3.1 ΜΑΓΓΑΝΙΟ ΚΑΙ ΝΟΣΟΣ PARKINSON	21
1.3.2 ΜΑΓΓΑΝΙΟ ΚΑΙ ΝΟΣΟΣ ALZHEIMER.....	22
1.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ	23
1.4.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ICP-OES.....	23
1.4.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ICP-MS.....	26
1.4.5 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	28
1.4.6 Η ΜΕΘΟΔΟΣ HPLC- ICP- MS	32
1.5 ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....	33
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	37
2.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ-ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΡΟΗΣ	38
2.2. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ-ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ.....	41
2.3. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	42
2.3.1 ICP-OES (ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ).....	42
2.3.2 ICP-MS (ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ).....	43

2.3.3 ΣΥΣΚΕΥΗ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗΣ.....	44
2.4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	40
2.5.ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	45
2.5.1 ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ.....	45
2.5.2 ΟΛΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ.....	45
2.5.3 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ (LMM species).....	46
2.5.4 ΥΠΕΡΔΙΗΘΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	46
2.5.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΥΠΕΡΔΙΗΘΗΣΗ	47
2.5.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ LMM species ΤΟΥ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΥΠΕΡΔΙΗΘΗΣΗ... 48	
2.5.7 ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΟΥ ΑΚΟΛΟΥΘΗΘΗΚΑΝ	48
2.6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	49
2.6.1 ΟΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ (ICP-AES)	49
2.6.2 ΟΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ (ICP-MS).....	50
2.6.3 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ-ΕΙΔΟΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ LMM species	54
2.6.4 ΠΟΣΟΣΤΟ LMM species ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΟ ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΜΑΓΓΑΝΙΟ.....	56
2.6.5 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΣΩΛΗΝΩΝ ΥΠΕΡΔΙΗΘΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΡΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ	59
2.6.6 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ LMM species ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΥΠΕΡΔΙΗΘΗΣΗ	61
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	Error! Bookmark not defined.
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	70

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο “Ειδοταυτοποίηση Μαγγανίου σε δείγματα ορού αίματος με την μέθοδο HPLC-ICP-MS” πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της εκπαιδευτικής διαδικασίας στη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π.

Το πειραματικό μέρος της εργασίας πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια του ερευνητικού κέντρου HELMHOLTZ ZENTRUM (GSF- Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt GmbH) στα πλαίσια του προγράμματος ανταλλαγής φοιτητών “ERASMUS” της Ευρωπαϊκής Ένωσης, υπό την εποπτεία του καθηγητή κ. Bernhard Michalke, διευθυντή της ερευνητικής μονάδας “ Αναλυτικής Χημείας και Βιοχημείας”. Αξίζει να αναφερθεί πως ένα κομμάτι της παρούσας εργασία αποτελεί μέρος άρθρου που προγραμματίζεται να κατατεθεί για δημοσίευση στο επιστημονικό περιοδικό αναλυτικής χημείας Analytica Chimica Acta.

Την ανάθεση του θέματος, την επίβλεψη και το συντονισμό της παρούσας διπλωματικής εργασίας είχε η κα Μαρία Όξενκιουν-Πετροπούλου, Καθηγήτρια του Τομέα Χημικών Επιστημών, Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην κα Όξενκιουν-Πετροπούλου, για την ανάθεση του θέματος, τη συνεργασία που είχα μαζί της, την υπομονή που έδειξε μαζί μου και φυσικά τις πολύτιμες εμπειρίες που αποκόμισα τόσο απο την παραμονή μου στο Μόναχο όσο και απο την συνεργασία μας αυτή. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Peter Grill, μέλος της επιστημονικής μονάδας στο Μόναχο, για την συνεργασία μας και την βοήθεια που μου προσέφερε. Επίσης, σημαντική υπήρξε η βοήθεια και η καθοδήγηση και των συνεργατών του κ. Bernhard Michalke, κας Benker και κας Witte.

Τέλος, θεωρώ υποχρέωση μου να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την αμέριστη και ανιδιοτελή υποστήριξη τους.

Ασλάνογλου Λεωνίδα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μεγάλος αριθμός ασθενών ατόμων, οι οποίοι πάσχουν απο νευρολογικές ασθένειες όπως π.χ. η νόσος Alzheimer και η νόσος Parkinson έχει κινητοποιήσει πολλούς ερευνητές ανα τον κόσμο να ερευνήσουν τους παθογενείς παράγοντες που οδηγούν στις ασθένειες αυτές. Οι έρευνες έχουν εστιαστεί στην ταυτοποίηση και στον ποσοτικό προσδιορισμό των χημικών ειδών ορσμένων μετάλλων όπως το μαγγάνιο και ο σίδηρος. Η παρούσα εργασία αποτελεί μέρος μιας προσπάθειας να καθοριστούν τα φυσικά επίπεδα του μαγγανίου στον άνθρωπο.

Ο σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να επιτευχθεί η επαρκής παραλαβή των ενώσεων του μαγγανίου απο βιολογικά δείγματα ασθενών μέσω εκχύλισης, να πραγματοποιηθεί ποσοτικός προσδιορισμός της ολικής ποσότητας μαγγανίου και να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου που ακολουθήθηκε.

Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ορού αίματος και εγκεφαλονωτιαίου υγρού καθώς μέσω αυτών γίνεται η μεταφορά του μαγγανίου απο τα διάφορα όργανα στον εγκέφαλο.

Για τον διαχωρισμό και την ειδοταυτοποίηση των ενώσεων του μαγγανίου εφαρμόστηκαν υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) συνδεδεμένη σε σειρά (online) με την διάταξη της φασματομετρίας μάζας με διέγερση πλάσματος ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry).

Στην παρούσα εργασία, με χρήση της μεθόδου HPLC-ICP-MS σε συνδυασμό με την μέθοδο της υπερδιήθησης, γίνεται ταυτοποίηση των ενώσεων του μαγγανίου στα δείγματα ορού αίματος πριν και μετά την υπερδιήθηση με απώτερο σκοπό να αποδειχθεί, πως οι χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις του μαγγανίου στον ορό ανακτώνται απευθείας με την υπερδιήθηση. Αυτό είναι σημαντικό διότι οι χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις του μαγγανίου είναι ιδιαίτερα σημαντικές στον τομέα της παρακολούθησης της διαδρομής του μαγγανίου στον ανθρώπινο οργανισμό, ειδικότερα σε άτομα με σοβαρές νευρολογικές διαταραχές.

ABSTRACT

The large number of patients suffering from neurodegenerative diseases like Alzheimer's disease and Parkinson's disease motivates many research groups worldwide to investigate pathogenic factors of these diseases. Researches are focused on metal speciation for Mn and Fe. This work is part of an effort to determine and graphically project the basic levels of manganese in the human body.

The task of this work was to achieve a suitable extraction efficiency of manganese in biological samples of patients, to be able to analyse the quantity of the total amounts of manganese and finally to examine the efficiency of this method.

For the experiments human serum and cerebrospinal fluid were used, just because these samples are suitable to determine the total amount of manganese and its compounds. Mn-species are transported from the organs to the brain through the blood, therefore both serum and cerebrospinal fluid were studied.

For the separation and speciation of the manganese and its compounds High Performance Liquid Chromatography was used online with ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry).

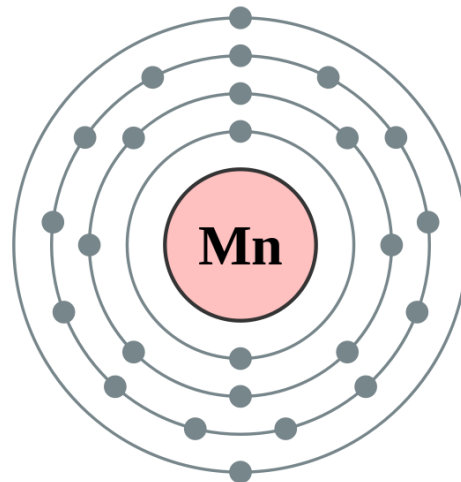
In this research, by using the HPLC-ICPS-MS method of analysis, combined with ultrafiltration tubes, manganese proteins are being extracted in order to come to the conclusion, that the low molecular mass compounds of manganese can be extracted straight through the ultrafiltration process. The importance of this research derives from the fact that, low molecular mass compounds of manganese are crucial for the biomonitoring of the path that manganese follows through the blood, especially for neurodegenerative diseased people.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ

1.1. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Το μαγγάνιο είναι το χημικό στοιχείο που συμβολίζεται στον Περιοδικό Πίνακα ως Mn και ανήκει στην ομάδα VIIb. Ιστορικά, το μαγγάνιο πήρε το όνομά του από τα διάφορα μαύρα ορυκτά (όπως πυρολουσίτη) που βρίσκονταν στην περιοχή της Μαγνησίας στην Ελλάδα, όπως αντίστοιχα συνέβει και σε στοιχεία με παρόμοιο άκουσμα όπως το μαγνήσιο και ο μαγνητίτης. Μέχρι τα μέσα του 18ου αιώνα, Σουηδός χημικός Καρλ Wilhelm Scheele είχε χρησιμοποιήσει πυρολουσίτη για την παραγωγή χλωρίου. Ο Scheele και άλλοι γνώριζαν ότι ο πυρολουσίτη (τώρα είναι γνωστό ότι είναι το διοξείδιο του μαγγανίου) περιλαμβάνει ένα νέο στοιχείο, αλλά δεν ήταν σε θέση να το απομονώσουν. Ο Johan Gottlieb Gahn έκανε την πρώτη απόπειρα απομόνωσης από ένα ακάθαρτο δείγμα του μαγγανίου το 1774, με αναγωγή του MnO_2 με άνθρακα. [1,2]



Εικόνα 1: Εμφάνιση και ηλεκτρονιακή δομή Μαγγανίου [1,2].

Ο ατομικός του αριθμός είναι 25, το ατομικό βάρος $54.9380 \text{ g.mol}^{-1}$, η ατομική του ακτίνα 140 pm, η ομοιοπολική του ακτίνα 139 pm και η ηλεκτρονική του δομή $[Ar]3d^54s^2$. Είναι ισχυρά όξινο με οξειδωτικές βαθμίδες 7,6,5,4,3,2, έχει κυβική κεντραρισμένη κρυσταλλική μορφή, πυκνότητα 7470 kg/m^3 και 6,0 σκληρότητα. Το σημείο τήξης του στοιχείου είναι $1244 \text{ }^\circ\text{C}$ και το σημείο βρασμού $1962 \text{ }^\circ\text{C}$. Στόν παρακάτω πίνακα περιλαμβάνονται κάποιες από τις ατομικές και φυσικοχημικές του ιδιότητες καθώς και στοιχεία ηλεκτροαντητικότητας και ενέργειας ιοντισμού. [3]

Πίνακας 1: Ατομικές και φυσικοχημικές ιδιότητες Μαγγανίου [1,2]

ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ	
Φυσική Κατάσταση	Στερεό
Μοριακός όγκος	7.21 g·cm ⁻³
Ενέργεια ατμοποίησης	221 kJ·mol ⁻¹
Ενέργεια σχηματισμού	12.91 kJ·mol ⁻¹
Τάση ατμών	1 k σε 1691 K
Ταχύτητα ήχου	(20 °C) 5150 m·s ⁻¹
Ηλεκτροαρνητικότητα	1.55 (Pauling scale)
Ενέργεια ιοντισμού	1ου: 717.3 kJ·mol ⁻¹ 2ου: 1509.0 kJ·mol ⁻¹ 3ου: 3248 kJ·mol ⁻¹
Ηλεκτρική αγωγιμότητα	(20 °C) 1.44 μΩ·m
Θερμική αγωγιμότητα	7.81 W·m ⁻¹ ·K ⁻¹

Το μαγγάνιο είναι ένα ασημί-γκρι μέταλλο που μοιάζει με σίδηρο είναι σκληρό και πολύ εύθραυστο, δύσκολο να λιώσει, αλλά εύκολο να οξειδωθεί. Τα κοινά του ιόντα του είναι παραμαγνητικά ενώ έχει την τάση να αμαυρώνεται αργά στον αέρα και να οξειδώνεται όπως ο σίδηρος, όταν θερμαίνεται και όταν εναποτίθεται σε νερό που περιέχει διαλυμένο οξυγόνο.

Το στοιχείο βρίσκεται σε αφθονία στη φύση, ενώ εμφανίζεται σε 4 αλλοτροπικές μορφές είτε συνθετικά παρασκευασμένες, είτε φυσικά, όπως θα δούμε στον παρακάτω πίνακα και παρουσιάζει ποικίλες ιδιότητες[4,5].

Πίνακας 2: Ισότοπα Μαγγανίου [3]

ΙΣΟΤΟΠΑ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ		
Ισότοπο	Αφθονία στη φύση	Χρόνος ημιζωής
⁵²Mn	Συνθετικά	5.591 ημέρες
⁵³Mn	Ίχνη Ραδιοισοτόπων	3,74 εκατομμύρια χρόνια
⁵⁴Mn	Συνθετικά	312,3 ημέρες
⁵⁵Mn	100%	Σταθερό

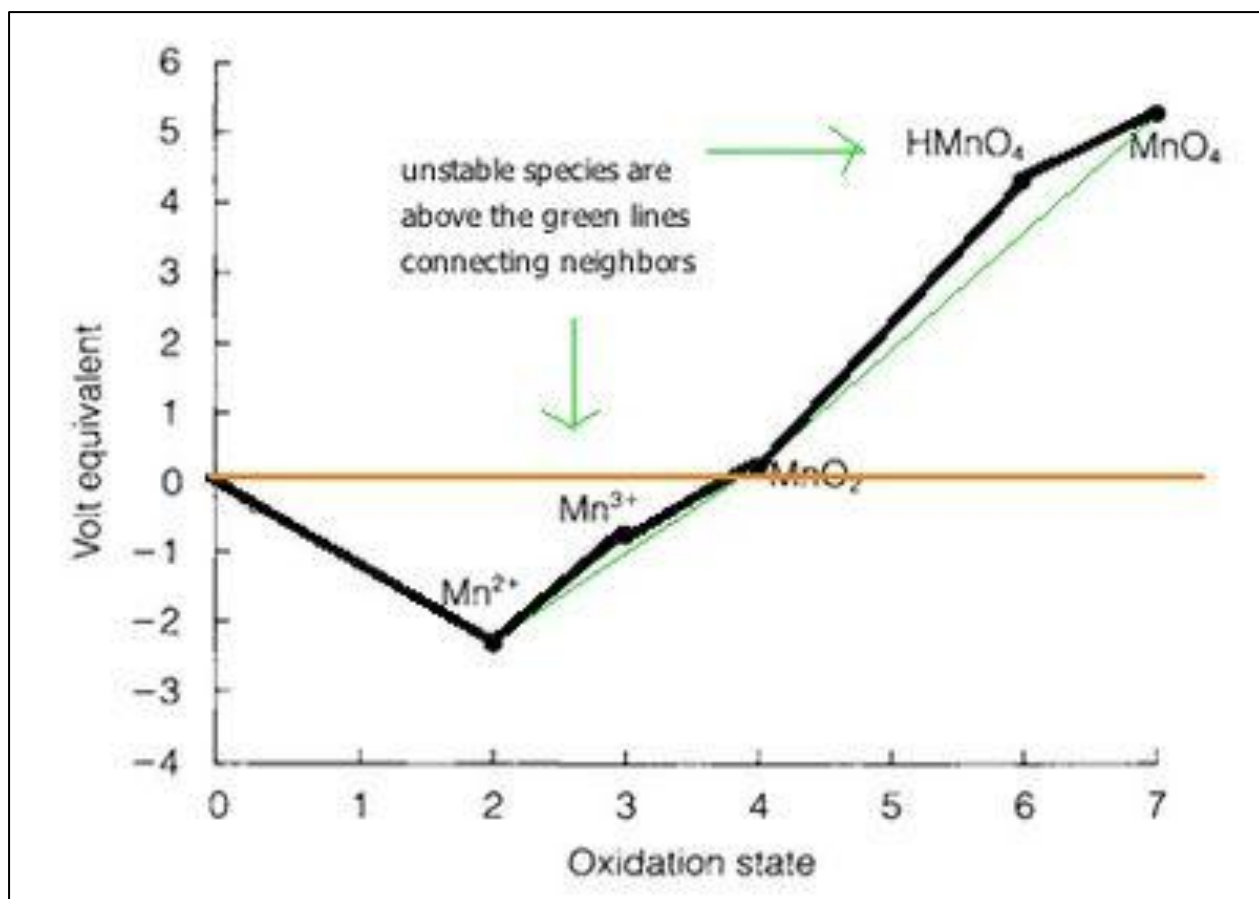
Ισότοπα ενός στοιχείου είναι τα νουκλίδια που έχουν ίδιο ατομικό αριθμό και διαφορετικό μαζικό αριθμό. Δεν υπάρχει περιορισμός στην εμφάνιση των ισοτόπων αλλά κατά κανόνα τα στοιχεία με μεγαλύτερο ατομικό αριθμό τείνουν να έχουν μεγαλύτερο αριθμό ισοτόπων. Όσον αφορά στο μαγγάνιο εκτός από το ισότοπο **⁵⁵Mn** το οποίο είναι το μόνο σταθερό που βρίσκεται στη φύση, υπάρχουν άλλα 17 συνθετικά. Εκτός από τα προαναφερθέντα (**⁵²Mn, ⁵³Mn, ⁵⁴Mn**) τα υπόλοιπα 14 έχουν ημιζωές που είναι λιγότερο από τρεις ώρες και η πλειοψηφία αυτών έχουν ημιζωές που είναι λιγότερο από ένα λεπτό. [6,7]

Παράλληλα οι ενθαλπίες σύνθεσης ενώσεων του ατόμου του μαγγανίου και άλλων στοιχείων παρατήθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3: Ενθαλπίες σύνθεσης Μαγγανίου [6,7]

ΕΝΘΑΛΠΙΕΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ	
Σύνθεση μαγγανίου με άλλα στοιχεία	Ενθαλπία σύνθεσης (Kj/mol)
Mn-H	234 ± 29
Mn-O	402,9 ± 41,8
Mn-S	301 ± 17
Mn-Se	239,3 ± 9,2
Mn-F	423,4 ± 14,6
Mn-Cl	360,7 ± 9,6
Mn-Br	314,2 ± 9,6
Mn-I	282,2 ± 9,6

Ενώσεις του μαγγανίου, οργανικές και ανόργανες βρίσκονται σε μεγάλη αφθονία στη φύση με διαφορετικές οξειδωτικές βαθμίδες και κυρίως στη βαθμίδα +2, αλλά και στη βαθμίδα +3 σε πιο ασταθή μορφή, στη βαθμίδα +4 κυρίως ως διοξείδιο του μαγγανίου MnO_2 και τέλος στις βαθμίδες +6 και +7 ως σταθερά ιόντα σε βασικά διαλύματα. Ανάλογα με την οξειδωτική του βαθμίδα, το μαγγάνιο μεταφέρεται και αντιδρά με δότες Οξυγόνου και Αζώτου. Στις βαθμίδες II και III το Μαγγάνιο λειτουργεί ως ασθενές οξύ για κατάλυση και στις βαθμίδες II, III, IV σε αντιδράσεις. Μια από τις πιο σημαντικές λειτουργίες των υψηλότερων οξειδωτικών βαθμίδων είναι η εμπλοκή τους στην έκλυση O_2 από τους χλωροπλάστες με τη φωτοσύνθεση, ενώ η επόμενη σημαντικότερη λειτουργία του αφορά την αφαίρεση του O_2 από το κυτόπλασμα των αερόβιων οργανισμών με αποτέλεσμα την προστασία τους από τις επιπτώσεις της οξείδωσης. Σε γενικές γραμμές οι υψηλότερες οξειδωτικές βαθμίδες του Μαγγανίου αποτελούν πολύ ισχυρούς οξειδωτικούς παράγοντες και παρότι υπάρχει σε πολύ χαμηλότερη διαθεσιμότητα από το Μαγνήσιο και το Ασβέστιο, παρολαυτά παίζει σημαντικό ρόλο σε αρκετές βιοχημικές λειτουργίες. Ο ρόλος του δεν διαφέρει σημαντικά από αυτόν των άλλων ιχνοστοιχείων καθώς εμπλέκεται στο σχηματισμό συγκεκριμένων δεσμών πρωτεϊνών, ενώ λόγω της κινητικής του διευκολύνει κάποιες βιοχημικές διεργασίες καθώς έχει την τάση να ανταλλάσει νερό και δεσμούς πολύ γρηγορότερα. [8,9,10] Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται ένα διάγραμμα των οξειδωτικών βαθμίδων του Μαγγανίου και το δυναμικό της οξειδοαναγωγής τους στον οποίο θα παρατηρήσουμε ότι οι χαμηλότερες βαθμίδες είναι πιο σταθερές, ενώ οι ψηλότερες, όπως αναφέραμε και προηγούμενα, εμφανίζονται να έχουν μεγαλύτερη οξειδωτική ισχύ.



Εικόνα 2: Διάγραμμα οξειδωτικών βαθμίδων. [15,16]

Εν συνεχεία στους παρακάτω πίνακες θα δούμε κάποιες σημαντικές οργανικές και ανόργανες ενώσεις του μαγγανίου σε συνδυασμό με τις οξειδωτικές τους βαθμίδες. Οι οργανικές ενώσεις του Μαγγανίου είναι κυρίως πρωτείνες με κυρίαρχο ρόλο στην παραγωγή ενζύμων. [9,10]

Πίνακας 4: Οργανικές ενώσεις μαγγανίου [1]

ΟΡΓΑΝΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ	ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΒΑΘΜΙΔΑ
Διοξυγενάση (Mn-dioxygenase)	II
Πυρουβική καρβοξυλάση (Pyruvate carboxylase)	II
Φωτοσύστημα II	II/IV
Οξύ φωσφατάση (Acid phosphatase)	III
Υπεροξυδική δισμουτάση (Mn-superoxide dismutase)	III
Γλυκοσυλαμινάση (glycosylaminase)	II
Ισοκιτρική αφυδρογονάση (Isocitrate dehydrogenase)	II
Προλίνη διπεπτάση (Proline dipeptase)	II
Υπεροξυδάση (Mn-peroxidase)	II/III
Καταλάση (Mn-catalase)	III
Γλουταμική συνθετάση (Glutamate synthetase)	II
Ιμιδαζολοφωσφορική γλυκερόλη αφυδρατάση (Imidazole glycerol phosphate dehydratase)	II
Οξαλική οξειδάση (Oxalate oxidase)	II
Κιτρικό (Mn-Citrate)	II
Κονκαβαλίνη A (Concavalin A)	II
Γαλακτοσυλό τρανσαφεράση (Galactosyl transferase)	II
Αργινάση (Arginase)	II
Ισοπροπυλομηλική συνθετάση (Isopropylmalate synthetase)	II

Οι ιδιότητες του μαγγανίου είναι σημαντικές για την βιομηχανία, το περιβάλλον μέχρι και τον ανθρώπινο οργανισμό τις οποίες θα αναλύσουμε με λεπτομέρεια σε ακόλουθα κεφάλαια. Για παράδειγμα το φωσφορικό μαγγάνιο χρησιμοποιείται σαν επικάλυψη για την αντιμετώπιση της σκουριάς και την πρόληψη της διάβρωσης σε χάλυβα. Επίσης ανάλογα με την κατάσταση οξειδωσης του μαγγανίου προκύπτουν διάφορα χρώματα τα οποία χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία ως χρωστικές ουσίες. Το διοξείδιο του μαγγανίου χρησιμοποιείται επίσης ως κάθοδος (δέκτης ηλεκτρονίων) σε μπαταρίες ψευδαργύρου-άνθρακα και αλκαλικές.

Στη βιολογία τα ιόντα του μαγγανίου λειτουργούν ως συνένζυμα για μια μεγάλη ποικιλία ενζύμων με πολλές λειτουργίες. Τα ένζυμα του είναι ιδιαίτερα σημαντικά στην αποτοξίνωση των ελεύθερων ριζών υπεροξειδίου σε οργανισμούς. Λειτουργεί επίσης στη συγκεντρωση οξυγόνου σε φωτοσυνθετικούς οργανισμούς ενώ εμφανίζεται ως βασικό ιχνοστοιχείο για όλους τους γνωστούς ζωντανούς οργανισμούς. Σε μεγαλύτερες ποσότητες, και προφανώς με πολύ μεγαλύτερη δραστηριότητα αν εισπνευθεί, μπορεί να προκαλέσει δηλητηρίαση με νευρολογικές βλάβες που μπορεί να είναι μη αναστρέψιμες.

1.2 ΡΟΛΟΣ ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ

1.2.1 ΤΟ ΜΑΓΓΑΝΙΟ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Το Μαγγάνιο βρίσκεται περίπου στο 0,085% έως 0,095% του φλοιού της γης και αποτελεί συστατικό πολλών τύπων πετρωμάτων, ιδίως ιζηματογενούς προέλευσης. Εμφανίζεται στο νερό, στο έδαφος και τους βράχους, ως ένωση σε συνδυασμό με το θείο, το οξυγόνο και το χλώριο . Είναι επίσης ένα ουσιαστικό στοιχείο για όλους τους ζωντανούς οργανισμούς, ως εκ τούτου οι μικρές ποσότητες απαιτούνται στο σώμα. Το μαγγάνιο χρησιμοποιείται κυρίως στην παραγωγή σιδήρου και χάλυβα για τη βελτίωση της αντοχής, της σκληρότητα και της ακαμψίας. Χρησιμοποιούνται επίσης σε τεράστια ποικιλία προϊόντων όπως πυροτεχνήματα, χρώματα, καλλυντικά, μπαταρίες και στη βενζίνη για τη βελτίωση της απόδοσής της. Επίσης βρίσκεται σε προϊόντα κεραμικής, σε λιπάσματα, σε απολυμαντικά και συντηρητικά. Το μαγγάνιο συναντάται φυσιολογικά στον ατμοσφαιρικό αέρα υπό μορφή αέριων σωματιδίων, στο έδαφος, στο νερό και στα τρόφιμα . Απελευθερώνεται στο περιβάλλον λόγω της σύστασής του και της χρήση και εμφάνισης του σε προϊόντα που περιέχουν μαγγάνιο, όπως είναι τα φυτοφάρμακα και τα στερεά και υγρά καύσιμα. Ως εκ τούτου η ανθρώπινη δραστηριότητα αυξάνει κατά πολύ τις συγκεντρώσεις μαγγανίου [65].

Στατιστικά το μαγγάνιο βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στις αγροτικές περιοχές (40 ng/m^3) και στους ωκεανούς (14 ng/m^3) ενώ όπως είναι λογικό βρίσκεται σε τεράστιες συγκεντρώσεις στην Ευρώπη (166 ng/m^3) και στις ΗΠΑ (93 ng/m^3). Μεγάλη επιρροή στη συγκέντρωση μαγγανίου στους υδάτινους πόρους έχει η ρύπανση από τη βιομηχανία καθώς και οι αλλοιωμένες εγκαταστάσεις υπόγειων υδάτων που μπορούν να φτάσουν τα επίπεδα συγκέντρωσης μέχρι και $9,6 \text{ mg/l}$. Όσον αφορά τα επιτρεπτά όρια συγκέντρωσης σε πόσιμο νερό, τουλάχιστον στην Ευρωπαϊκή Ένωση, τα ανώτατα επιτρεπτά δεν πρέπει να ξεπερνούν τα $0,05 \text{ mg/l}$. [11]

Ο άνθρωπος μπορεί να εκτεθεί σε χαμηλές συγκεντρώσεις μαγγανίου που οφείλονται στην φυσική του παρουσία στο περιβάλλον. Η κυριότερη πηγή πρόσληψης μαγγανίου από τον άνθρωπο είναι η κατανάλωση τροφίμων ή πόσιμου νερού . Ξηροί καρποί, δημητριακά, φασόλια και τσάι είναι πλούσια σε

μαγγάνιο. Ως εκ τούτου οι χορτοφάγοι μπορεί να έχουν υψηλότερη πρόσληψη μαγγανίου από το μέσο άτομο. Επίσης οι άνθρωποι που εργάζονται στον τομέα του χάλυβα, οι συγκολλητές μπορεί να εκτεθούν σε υψηλότερα επίπεδα μαγγανίου, αλλά ο έλεγχος για την διατήρηση των ασφαλών ορίων στις περισσότερες περιπτώσεις επιβάλλονται για την προστασία των εργαζομένων. Οι δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία εξαρτώνται από τον τρόπο και την ποσότητα στην οποία είναι εκτεθειμένος ο άνθρωπος, αλλά η δυσκολία βρίσκεται στον έλεγχο και την παρακολούθηση των επιπέδων συγκέντρωσης σε κάθε περίπτωση, λόγω των πολλαπλών μορφών του και τρόπων που μπορεί να το συναντήσει. [6,7,11]

Εκτός από τις θετικές και αρνητικές επιδράσεις του στον ανθρώπινο οργανισμό, οι οποίες θα αναλυθούν στο επόμενο κεφάλαιο, πρέπει να σημειώσουμε ότι το μαγγάνιο επηρεάζει σημαντικά την χλωρίδα και την πανίδα. Η εμφάνιση του στο χρώμα προκαλεί σημαντικές διαταραχές στην ανάπτυξη της πανίδας, λόγω πρόκλησης τοξικότητας και μαρασμού καθώς και αδυναμίας αποσύνθεσης του μορίου του νερού. Για τα ζώα όπως και για τον ανθρώπινο οργανισμό το μαγγάνιο είναι απαραίτητο για την παραγωγή ενζύμων που συμβάλουν στο μεταβολισμό πρωτεϊνών, υδατανθράκων και λιπαρών. Παρολαυτά οι υψηλές συγκεντρώσεις μπορούν να αποβούν μοιραίες σε κάποιες κατηγορίες ζώων καθώς μπορούν να οδηγήσουν σε σοβαρές διαταραχές ζωτικών οργάνων, επικίνδυνη πτώση της πίεσης του αίματος, διαταραχές ανάπτυξης των εμβρύων και σε κάποιες περιπτώσεις εξετάζεται η επίδραση των υψηλών συγκεντρώσεων στην ανάπτυξη όγκων. [11]

1.2.2 ΤΟ ΜΑΓΓΑΝΙΟ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ

Όπως ήδη αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, το Μαγγάνιο είναι το τέταρτο σε χρήση μέταλλο στον κόσμο μετά το Σίδηρο, τον Άργιλο και τον Χαλκό και συναντάται σε ποικίλες δραστηριότητες της καθημερινότητας, κάποιες από τις οποίες θα αναφερθούν πιο αναλυτικά στη συνέχεια.

Αρχικά το Μαγγάνιο παίζει πάρα πολύ σημαντικό ρόλο στον τομέα της σιδηρουργίας και πιο συγκεκριμένα στην επεξεργασία του χάλυβα ως στοιχείο ανάμιξης, ενώ χρησιμοποιείται ευρέως στη δημιουργία κραμάτων με σκοπό τη βελτίωση των ιδιοτήτων των μετάλλων και την διασφάλιση πολύ σημαντικά

τεχνικά οφελών σε διάφορες διεργασίες παραγωγής προϊόντων μετάλλου. Εκτός από την χρήση του στη σιδηρουργία, χρησιμοποιείται σε μορφή διοξειδίου στην παραγωγή ξηρών μπαταριών ενώ πολλές άλλες ενώσεις του χρησιμοποιούνται στην παραγωγή χρωμάτων, στην παραγωγή γυαλιού καθώς και στην παρασκευή λιπασμάτων, φαρμάκων και συμπληρωμάτων διατροφής. Τέλος ένας πολύ σημαντικός ρόλος του μαγγανίου συγκεντρώνεται στη βελτιστοποίηση παραγωγής βενζίνης, καθώς αποτελεί βασικό στοιχείο αντικατάστασης του μολύβδου για την παραγωγή αμόλυβδων βενζινών υπό τη μορφή της ένωσης Methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl (MMT) που αν και χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία σε χώρες όπως η Γαλλία, η Ρωσία, η Βουλγαρία, στην Αργεντινή και στη Νέα Ζηλανδία. Παρ'όλα αυτά παρατηρούνται πολλές ενστάσεις όσον αφορά το περιβαλλοντικό κόστος και τις επιπτώσεις στην υγεία από τις εκπομπές αέριων ρύπων και πολλά κράτη, μεταξύ αυτών και οι ΗΠΑ, έχουν απαγορεύσει τη διανομή του MMT [11].

1.2.3 ΕΠΙΠΕΔΑ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Όσον αφορά στον ανθρώπινο οργανισμό, ο ρόλος του μαγγανίου είναι διττός. Από τη μια αποτελεί ένα ζωτικής σημασίας στοιχείο για τον ανθρώπινο οργανισμό και την ορθή μεταβολική λειτουργία, αλλά από την άλλη οι υψηλές συγκεντρώσεις του μπορούν να αποβούν ιδιαίτερα τοξικές και επιβλαβείς. Το φυσιολογικό εύρος ημερήσιας πρόσληψης μαγγανίου για την ομαλή λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού είναι από 2mg έως 5mg για τους ενήλικες. Ωστόσο έχει παρατηρηθεί ότι σε περιπτώσεις χορτοφαγίας ή κατανάλωσης παραπλήσιων κατηγοριών τροφών και αφεψημάτων όπως το τσάι μπορούν να αυξήσουν την πρόσληψη αυτή μέχρι και στα 20 mg ημερησίως. Επίσης η πρόσληψη μαγγανίου μπορεί να επηρεαστεί σημαντικά από την συγκέντρωσή του στο πόσιμο νερό ανάλογα με την τοποθεσία και τις συνθήκες ύδρευσης καθώς και από τον τρόπο παρασκευής της τροφής. Η μικρότερη πρόσληψη αναλογικά γίνεται από τα σωματίδια του ατμοσφαιρικού αέρα με δεύτερο το νερό και τρίτη την τροφή [12].

Η εισπνοή υψηλών συγκεντρώσεων μαγγανίου μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό του στομάχου, βήχα, πονόλαιμο, σφίξιμο στο στήθος, κεφαλαλγία και πυρετό. Μερικές φορές, προκαλεί επίσης μια μεταλλική γεύση στο στόμα, ναυτία, εμετό

και θολή όραση. Η κατανάλωση τροφίμων ή ποτών μολυσμένων με μεγάλες ποσότητες μαγγανίου μπορεί να προκαλέσει επίσης ερεθισμό του στομάχου ενώ σε μικρές ηλικίες εξαιρετικά υψηλή έκθεση σε μαγγάνιο μπορεί να επηρεάζει την ανάπτυξη του εγκεφάλου. Ως εκ τούτου τα παιδιά είναι πολύ πιο ευαίσθητα από του ενήλικες ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι η έκθεση κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης είναι πιθανό να προκαλέσει βλάβες στο έμβρυο σε δόσεις όπου η μητέρα μπορεί να εμφανίζεται ανεπηρέαστη. Επίσης η παρατεταμένη έκθεση σε υψηλά επίπεδα μαγγανίου ευθύνεται για την παρουσίαση ενός σοβαρού συνδρόμου που ονομάζεται «Μαγγανισμός» και τα συμπτώματά του μοιάζουν πολύ με τα συμπτώματα της σχιζοφρένειας και του Parkinson. Η παρουσία αδυναμίας, νευρικότητας, ψυχολογικών διαταραχών, βήχα και δύσπνοιας, βίαιης συμπεριφοράς, συναισθηματικής αστάθειας, παραισθήσεων, δυσκολίας στην ομιλία είναι από τα πιο συνήθη συμπτώματα σε αυτή την περίπτωση. Παράλληλα έχει παρατηρηθεί ότι άτομα με υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να παρουσιάσουν υπέρταση, ενώ σε ασθενείς με ηπατίτιδα και κίρρωση τα επίπεδα μαγγανίου ξεπερνούν κατά πολύ το φυσιολογικό. Τέλος δεν υπάρχουν στοιχεία σχετικά με το αν το μαγγάνιο προκαλεί καρκίνο στον άνθρωπο [12,13].

Σε γενικές γραμμές ο μέσος άνθρωπος έχει περίπου 2,5-5 μg μαγγανίου στο σώμα του, υπό φυσιολογικές συνθήκες. Ανεξάρτητα από τον τρόπο πρόσληψής του, το ποσοστό απορρόφησής του εξαρτάται σημαντικά από τη διαλυτότητα των ενώσεών του καθώς και από την συγκέντρωση σιδήρου στον οργανισμό.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα επίπεδα του ιχνοστοιχείου σε διάφορους ιστούς του ανθρώπινου σώματος.

Πίνακας 5: Συγκεντρώσεις Μαγγανίου στους ανθρώπινους ιστούς. [12]

ΙΣΤΟΣ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ (µg/L)
Συκώτι	1,68
Πάγκρεας	1,21
Νεφρά	0,93
Πνεύμονας	0,34
Εγκέφαλος	0,34
Καρδιά	0,23
Σπλήνα	0,22

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το μαγγάνιο παίζει σημαντικό ρόλο σε ποικίλες μεταβολικές δράσεις του οργανισμού και λειτουργεί ως συνένζυμο για τη δομή και τη λειτουργία των κυττάρων, για τη σύνθεση γλυκοπρωτεϊνών και για την ενεργοποίηση ενζύμων όπως οι Αμινοπεπτιδάσες που επηρεάζουν την λειτουργία της πέψης, της Φωσφορικής τρανσαφοράσης που εμπλέκεται στη γλυκόλυση και τον μεταβολισμό των λιπιδίων, ενώ μια από τις σημαντικότερες λειτουργίες είναι η επίδραση σε λειτουργίες ενζύμων που επηρεάζουν τον σχηματισμό ιστών και χόνδρων καθώς και την αποφυγή εκφυλισμού των νευρικών απολήξεων. Όπως και σε πολλές άλλες περιπτώσεις συγκέντρωσης μετάλλων στον οργανισμό, η απόκλιση από τα φυσιολογικά όρια μπορεί να έχει σοβαρές επιπτώσεις θετικές ή αρνητικές σε πολλές φυσικές και βιοχημικές διεργασίες του οργανισμού. Η έλλειψη μαγγανίου στον οργανισμό μπορεί να επηρεάζει σημαντικά τη ανεπάρκεια σημαντικών ενζύμων που έχουν ως άμεσες ή έμμεσες συνέπειες την δυσλειτουργία του μυϊοσκελετικού, στα επίπεδα σακχάρου στο αίμα, στην απώλεια βάρους και στην παρουσία δερματικών διαταραχών [12,13].

Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει συνοπτικά τις θετικές και αρνητικές επιπτώσεις που περιγράψαμε σε περιπτώσεις φυσιολογικών και ελλείπων δεικτών καθώς και τοξικότητας από υπερβολική έκθεση.

Πίνακας 6: Φυσιολογικά όρια Μαγγανίου στον οργανισμό και επιπτώσεις.

[14]

<u>Εντός φυσιολογικών ορίων.</u>	<u>Μειωμένη Ποσότητα.</u>	<u>Αυξημένη Ποσότητα.</u>
Κανονική ανάπτυξη μυοσκελετικού και εριστικού συστήματος.	Ασθενείς τένοντες και σύνδεσμοι.	Ψυχιατρικές διαταραχές.
Απαραίτητο για τη χρήση της γλυκόζης.	Προβλήματα ακοής.	Διανοητική σύγχυση.
Σύνθεση και μεταβολισμός των λιπιδίων.	Αστάθεια, νευρικότητα.	Εξασθενημένη μνήμη.
Μεταβολισμός χοληστερόλης.	Ατονία, λιποθυμία.	Ανορεξία.
Παγκρεατική λειτουργία και ανάπτυξη	Διαβήτης (λόγω αδυναμίας μεταβολισμού της γλυκόζης)	Αδυναμία έκφρασης.
Πρόληψη στειρότητας.	Μυασθένεια, μυοπάθεια, μυϊκή αδυναμία.	Σπαστικότητα, νευρικότητα.
Μεταβολισμός πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων.	Υπογονιμότητα.	Νευρολογικές δυσλειτουργίες.
Ενεργοποίηση λειτουργιών ενζύμων.	Διαταραχές ανάπτυξης και σκελετικής δομής.	
Σύνθεση ορμονών θυρεοειδούς.	Μιτοχονδριακές διαταραχές.	
	Κατάθλιψη	

1.3 ΜΑΓΓΑΝΙΟ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

1.3.1 ΜΑΓΓΑΝΙΟ ΚΑΙ ΝΟΣΟΣ PARKINSON

Η ασθένεια γνωστή ως Parkinson's disease θεωρείται ότι αποτελεί μια βιοχημική ανωμαλία του οργανισμού του ανθρώπου η δε εξέλιξη της είναι μακροχρόνια, με βαθμιαία πρόοδο (επιδείνωση), με την πάροδο του χρόνου με σοβαρές συνέπειες πάνω στην υγεία και τη ζωή του ασθενούς.

Σύμφωνα με υπολογισμούς της γνωστής κλινικής MAYO των ΗΠΑ, ένα ποσοστό ίσο με το δύο τις εκατό, (2%), του όλου πληθυσμού της μεγάλης αυτής δημοκρατίας, θα προσβληθεί από την ασθένεια του Πάρκινσον, με ταχύτητα 50.000 νέες περιπτώσεις το χρόνο [12].

Βασικά τα συμπτώματά της εμφανίζονται όταν ο εγκέφαλος του ανθρώπου αδυνατεί να παραγάγει μια χημική ουσία, πολύ ιδιαίτερης σημασίας για τη σωστή λειτουργία του οργανισμού, γνωστή ως ντοπαμίνη, εξ αιτίας κάποιας αφύσικης απώλειας νευρώνων, στον εγκέφαλο. Έτσι λοιπόν ιατρικές έρευνες απέδειξαν ότι το επιπλέον μαγγάνιο το οποίο υπάρχει στον οργανισμό του ανθρώπου αντιδρά με την ντοπαμίνη την οποία παράγει ο εγκέφαλος μας, και η οποία συμβάλλει στη δημιουργία μια νέας χημικής ουσίας η οποία καταστρέφει τα μόρια του εγκεφαλικού συστήματος, με αποτέλεσμα την εμφάνιση και ανάπτυξη της αρρώστιας του Πάρκινσον.

1.3.2 ΜΑΓΓΑΝΙΟ ΚΑΙ ΝΟΣΟΣ ALZHEIMER

Η νόσος Αλτσχάιμερ είναι η πιο κοινή μορφή άνοιας. Είναι μια ασθένεια μη θεραπεύσιμη, εκφυλιστική και θανατηφόρα η οποία περιγράφηκε αρχικά από το Γερμανό ψυχίατρο και νευροπαθολόγο Αλοΐσιο Αλτσχάιμερ το 1906 (εξ ου και το όνομα). Γενικά εντοπίζεται στους ανθρώπους πάνω από 65 ετών , αν και το λιγότερο συχνά, πρόωρο Αλτσχάιμερ μπορεί να εμφανιστεί πολύ νωρίτερα, ίσως και πριν τα 50. Η διερεύνηση για διάγνωση Αλτσχάιμερ σε πιθανούς ασθενείς επιβεβαιώνεται συνήθως με διανοητικές αξιολογήσεις και γνωστικές δοκιμές, που ακολουθούνται συχνά από ακτινογραφίες του εγκεφάλου. Με την πρόοδο της ασθένειας, τα συμπτώματα περιλαμβάνουν σύγχυση, οξυθυμία, επιθετικότητα, ταλάντευση διάθεσης, διακοπή ομιλίας, απώλεια της μακροπρόθεσμης μνήμης, και τη γενική κοινωνική απόσυρση του πάσχοντος καθώς οι αισθήσεις του μειώνονται. Το 2009 εκφράστηκε μια θεωρία, προτείνοντας ότι ένας στενός συγγενής της πρωτεΐνης βήτα αμυλοειδούς, και όχι απαραίτητως το ίδιο το βήτα αμυλοειδές, μπορεί να είναι κύριος ένοχος για την ασθένεια. Η θεωρία υποστηρίζει ότι ένας αμυλοειδής συγγενής μηχανισμός που κόβει τις νευρωνικές συνδέσεις στον εγκέφαλο στην αρχική φάση της ζωής μπορεί να ενεργοποιείται στην γεροντική ηλικία για να προκαλέσει το

νευρωνικό μαρασμό του Αλτσχάιμερ. Άτομα που παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα μαγγανίου στον οργανισμό τους έχουν πολλές πιθανότητες να παρουσιάσουν συμπτώματα της ασθένειας Αλτσχαιμερ διότι το μαγγάνιο συμμετέχει ενεργά στις νευρωνικές συνδέσεις του εγκεφάλου. Η ασθένεια αυτή γνωστή ως Alzheimer's disease έχει αποδειχθεί πως συνδέεται άμεσα με την νευροτοξικότητα του μαγγανίου. [13,14]

1.4 ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΤΟΥ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ

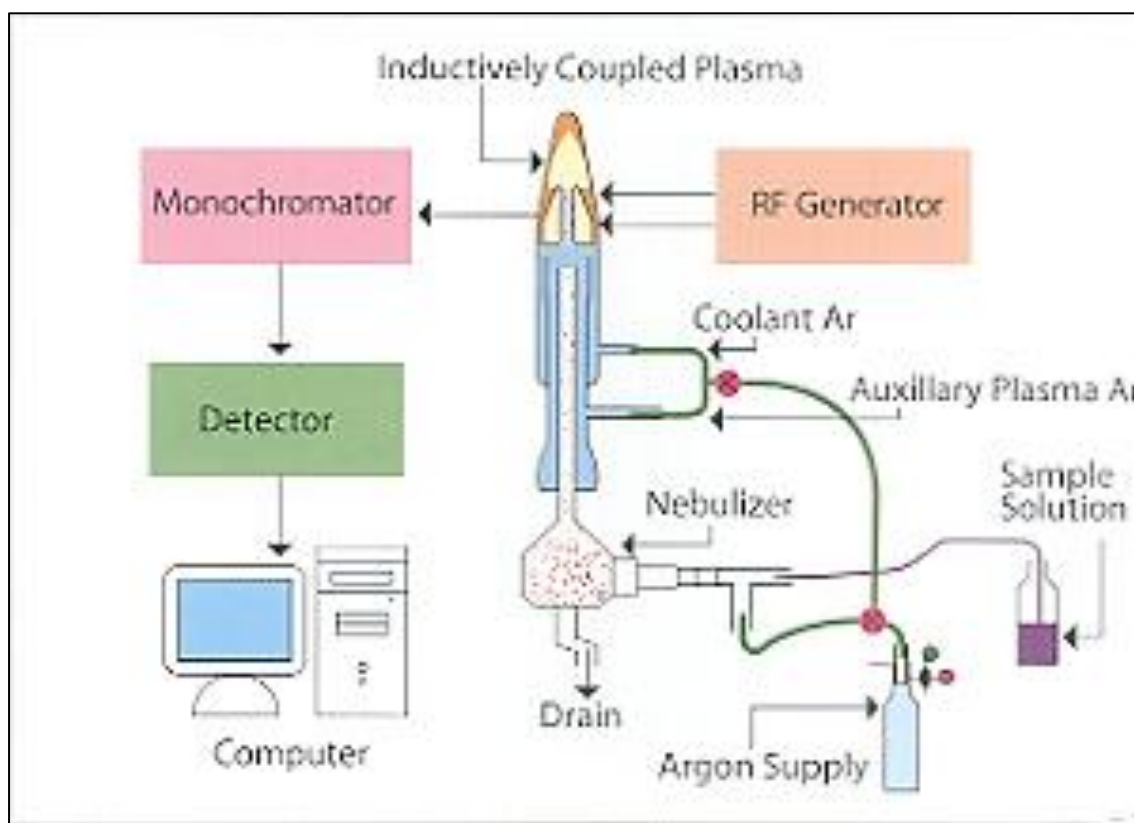
Σύμφωνα με τις τρέχουσες γνώσεις, οι περιοχές του εγκεφάλου οι οποίες επηρεάζονται περισσότερο από την συσσώρευση Mn είναι η ωχρή σφαίρα και η μέλαινα ουσία [63]. Ο ακριβής μηχανισμός πρόσληψης του μαγγανίου στον εγκέφαλο δεν έχει ακόμη ανακαλυφθεί. Μέχρι στιγμής, είναι γενικά αποδεκτό ότι το Mn μπορεί να διασχίσει τα νευρωνικά εμπόδια μέσω πολλών φορέων και σε διάφορες καταστάσεις οξειδωσης, δεδομένου ότι η απορρόφηση του Mn, η μεταφορά και τα επίπεδα των ιστών είναι αυστηρά ρυθμιζόμενα [64]. Έχει επίσης προταθεί, πρόταση η οποία ερευνάται στην παρούσα εργασία, ότι το κιτρικό σύμπλοκο του μαγγανίου παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδρομή του Mn στον ανθρώπινο οργανισμό [66]. Το μαγγάνιο δεν είναι μόνο συμπάραγοντας σημαντικών αντι-οξειδωτικών ενζύμων, αλλά επίσης και ενζύμων που εμπλέκονται στην σύνθεση νευροδιαβιβαστών καθώς και στον μεταβολισμό των νευροδιαβιβαστών. Επίσης το Mn-κιτρικό, είχε διατυπωθεί η υπόθεση, πως αποτελεί το πιο σημαντικό σύμπλοκο μαγγανίου, που μετά την έκθεση σε Mn διαπερνά τους νευρονικούς φραγμούς [42]. Υπήρξε η υπόθεση ότι η αυξημένη συγκέντρωση του κιτρικού συμπλόκου του Mn στον ορό αίματος θα μπορούσε να είναι ένας πολύτιμος δείκτης για αυξημένη συνολική συγκέντρωση Mn στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, δηλαδή ένας βιοδείκτης για αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης νευρολογικών διαταραχών οφειλόμενες στο μαγγάνιο [46].

1.5 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ

1.5.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ICP-OES

Η φασματομετρία ατομικής εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα είναι μια αναλυτική μέθοδος ανίχνευσης ιχνών μετάλλων. Είναι μια μορφή φασματομετρίας εκπομπής ακτινοβολίας που χρησιμοποιεί πλάσμα αργού υψηλής ενέργειας για την παραγωγή ατόμων και ιόντων που εκλύουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία σε συχνότητες αντίστοιχες κάποιου συγκεκριμένου στοιχείου. Η ένταση της εκπομπής είναι χαρακτηριστική της συγκέντρωσης του στοιχείου μέσα στο δείγμα. [15,16,19]

ΤΟ ICP-OES περιλαμβάνει δυο μέρη: το οπτικό φασματομέτρο και το ICP. Το ICP περιλαμβάνει 3 ομόκεντρους γυάλινους σωλήνες. Η έξοδος του πηνίου ραδιοσυχνότητας περιβάλλει το ICP ενώ, το πλάσμα δημιουργείται κυρίως από αργό αέριο.



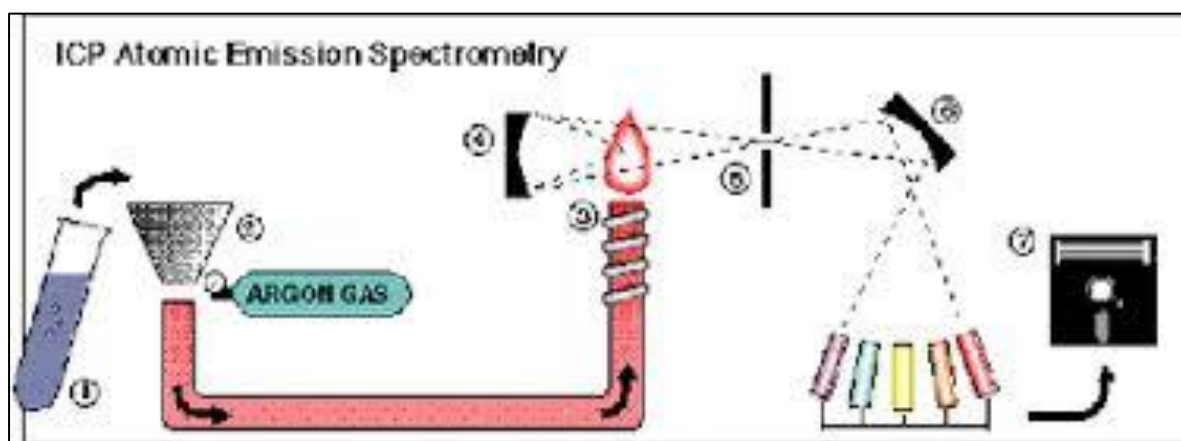
Εικόνα 3: Διάγραμμα μεθόδου ICP-OES [21]

Όταν το ICP είναι σε λειτουργία, δημιουργείται ένα έντονο ηλεκτρομαγνητικό εντός του πηνίου από την υψηλής ενέργειας ραδιοφωνική συχνότητα η οποία περνάει μέσα στο πηνίο. Το σήμα δημιουργείται από έναν υψηλής ενέργειας αναμεταδότη ο οποίος οδηγεί το πηνίο όπως ακριβώς ένας τυπικός ραδιοφωνικός πομπός οδηγεί μια κεραία εκπομπής. Το αργό περνάει μέσα από

τον πυρσό και αναφλέγεται από ένα κύκλωμα Tesla που έχει ως αποτέλεσμα την πυροδότηση της παραγωγής ιόντων και ηλεκτρονίων. Με την ανάφλεξη του πλάσματος το κύκλωμα κλείνει. [19,20,21]

Το αργό ιονίζεται και ένα έντονο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο περνά με έναν συγκεκριμένο κυκλικό συμμετρικό τρόπο προς το μαγνητικό πεδίο του πηνίου. Ως εκ τούτου ενεργοποιείται ένα σταθερό, υψηλής θερμοκρασίας πλάσμα, αποτέλεσμα των ανελαστικών συγκρούσεων μεταξύ των ουδέτερων ατόμων αργού και των φορτισμένων σωματιδίων.

Η περισταλτική αντλία παράγει ένα υδαρό ή οργανικό δείγμα, το οποίο εναποτίθεται σε έναν εκνεφωτή από τον οποίο ιονίζεται σε επαφή με το πλάσμα. Τα μόρια διασπώνται και εκπέμπουν ακτινοβολία σε συγκεκριμένες συχνότητες ανάλογα με τα στοιχεία που εμπλέκονται.



Εικόνα 4: Διάγραμμα μεθόδου ICP-OES [21]

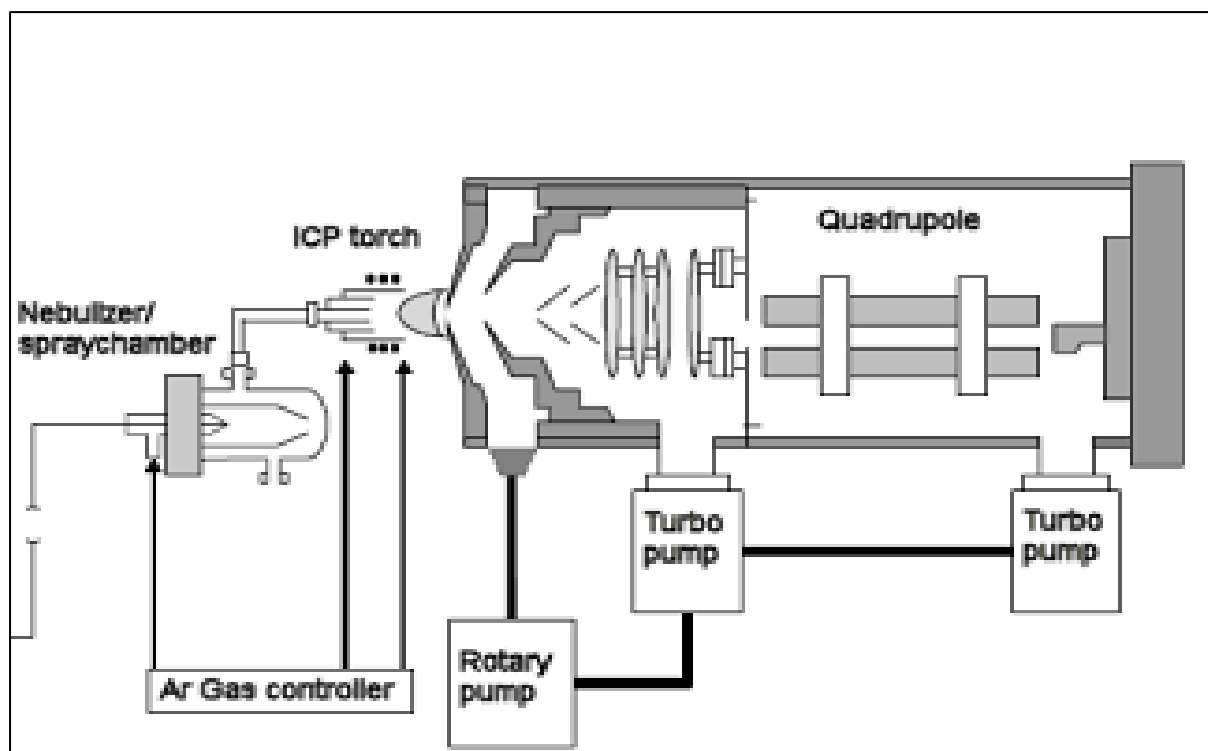
Οι εκπεμπόμενες ακτινοβολίες περνούν από τη σχισμή του οπτικού θαλάμου και χτυπούν σε ένα κοίλο κάτοπτρο, το οποίο στη συνέχεια διαχωρίζει την πολυχρωματική ακτινοβολία του πλάσματος σε μονοχρωματικές ακτινοβολίες οι οποίες χτυπούν σε ένα δεύτερο κάτοπτρο στη συνέχεια σε έναν φωτοπολλαπλασιαστή, μετατρέπονται και μετατρέπονται σε ηλεκτρικό ρεύμα. Η ένταση της κάθε γραμμής συγκρίνεται με προηγούμενες εντάσεις προηγούμενα καταγεγραμμένων συγκεντρώσεων στοιχείων και αναγνωρίζονται.

Η ICP-OES χρησιμοποιείται πιο συχνά στην ανάλυση ιχνοστοιχείων του εδάφους και αυτός είναι ο λόγος που πολλές φορές εφαρμόζεται σε εγκληματολογικές

έρευνες και σε γεωργικές αναλύσεις. Επίσης έχει εφαρμογές στην ανάλυση των καυσίμων και σε ποιοτικούς ελέγχους παραγωγής και βιομηχανίας. [20,21]

1.5.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ICP-MS

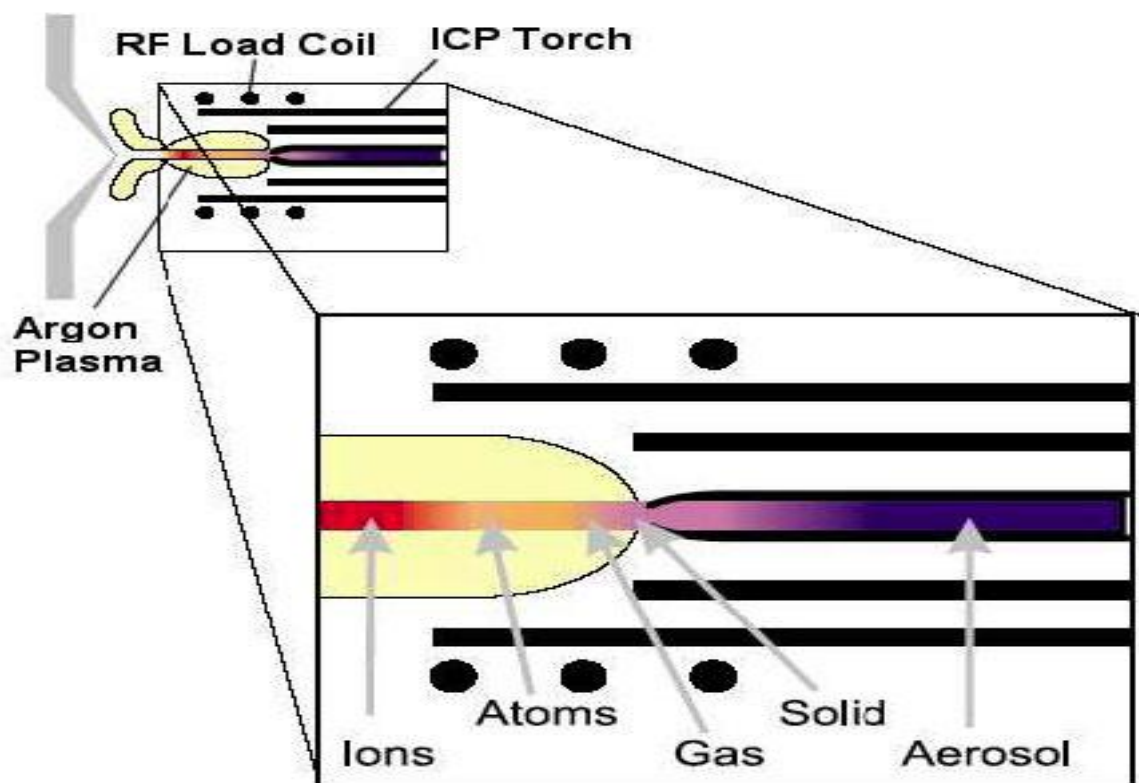
Η μέθοδος ICP-MS είναι ένας τύπος φασματογραφίας μάζας μέσω της οποίας προσδιορίζονται μέταλλα και αμέταλλα σε πάρα πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Αυτό επιτυγχάνεται με τον ιονισμό του δείγματος πλάσματος με τη χρήση φασματογράφου μάζας για τον διαχωρισμό και τη ποσοτικοποίηση αυτών των ιόντων.



Εικόνα 5: Διάγραμμα μεθόδου ICP-MS [22]

Ένα επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα ενεργοποιείται από την επαγωγική θέρμανση του αερίου με ηλεκτρομαγνητικό πηνίο και περιλαμβάνει επαρκείς συγκεντρώσεις ιόντων και ηλεκτρονίων για την δημιουργία αγωγίου αερίου. Ακόμα κι ένα μερικώς ιονισμένο αέριο, στο οποίο μόνο το 1% των σωματιδίων

είναι ιονισμένα, μπορεί να έχει τα χαρακτηριστικά του πλάσματος. Το πλάσμα που χρησιμοποιείται στην φασματοχημική ανάλυση πρέπει να είναι ουδέτερο, με κάθε θετικό φορτίο σε ένα ιόν να βρίσκεται σε ισορροπία με ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο. [17,18]



Εικόνα 6: Διάγραμμα μεθόδου ICP-MS [22]

Το επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα για την φασματομετρία παράγεται σε έναν πυρσό που περιλαμβάνει τρεις ομόκεντρους σωλήνες, συνήθως από χαλαζία. Το κάτω μέρος του πυρσού τοποθετείται μέσα σε ένα πηνίο επαγωγής που διοχετεύει ηλεκτρικό φορτίο με ραδιοσυχνότητες. Αργό αέριο διοχετεύεται μεταξύ των πιο εξωτερικών σωληνίων του πυρσού και μια ηλεκτρική ανάφλεξη βοηθά στην παροχή ελευθέρων ηλεκτρονίων στη ροή του αερίου. Αυτά τα ηλεκτρόνια αλληλεπιδρούν με το μαγνητικό πεδίο της ραδιοσυχνότητας στο πηνίο επαγωγής και προωθούνται προς μια κατεύθυνση και μετά προς την άλλη καθώς το πεδίο αλλάζει στις υψηλές συχνότητες. Τα ενεργοποιημένα ηλεκτρόνια συγκρούονται με τα άτομα του αργού και σε κάποιες περιπτώσεις η σύγκρουση προκαλεί τον διαχωρισμό του ατόμου του αργού με κάποιο από τα ηλεκτρόνια του. Το ηλεκτρόνιο που απελευθερώνεται φορτίζεται από το μαγνητικό φορτίο

που αλλάζει συνεχώς. Η διαδικασία συνεχίζει μέχρι να φτάσουμε στο σημείο όπου η αναλογία των νέων ηλεκτρονίων που απελευθερώνονται είναι σε ισορροπία με την αναλογία επανασύνδεσης των ηλεκτρονίων με ιόντα αργού. Αυτό δημιουργεί μια φλόγα που περιλαμβάνει κυρίως άτομα αργού και ένα μικρό ποσοστό ελεύθερων ηλεκτρονίων και ιόντων αργού.

Η μέθοδος ICP μπορεί να περιοριστεί στο πυρσό καθώς η ροή του αερίου μεταξύ των δυο πιο εξωτερικών σωλήνων κρατάει το πλάσμα μακριά από τα τοιχώματα του πυρσού. Μια δεύτερη ροή αργού διοχετεύεται συνήθως μεταξύ του κεντρικού και του ενδιάμεσου σωλήνα για να διατηρηθεί το πλάσμα μακριά από την άκρη του κεντρικού σωλήνα. Μια τρίτη ροή αερίου διοχετεύεται στον κεντρικό σωλήνα του πυρσού. Αυτή η ροή περνά από το κέντρο του πλάσματος, όπου σχηματίζει ένα κανάλι ψυχρότερο από τους περιβάλλοντες σωλήνες. Τα δείγματα που αναλύονται διοχετεύονται στο κεντρικό κανάλι συνήθως σαν ένα ατμοί σχηματίζονται από το πέρασμα του υγρού δείγματος από έναν εκνεφωτή.

Καθώς ένα σταγονίδιο του δείγματος από τον εκνεφωτή μπαίνει στο κεντρικό κανάλι, εξατμίζεται και οποιαδήποτε στερεά είχαν διαλυθεί στο υγρό σπάνε σε άτομα. Στις θερμοκρασίες αυτές μια σημαντική ποσότητα ατόμων πολλών χημικών στοιχείων ιονίζονται και κάθε άτομο χάνει το πιο χαλαρά συνδεδεμένο ηλεκτρονίο του δημιουργώντας ένα μονό φορτισμένο ιόν. [17,18]

Εν συνεχεία τα ιόντα του πλάσματος που διοχετεύονται από μια σειρά κώνων στον φασματογράφο μάζας, τα ιόντα διαχωρίζονται σύμφωνα με την αναλογία μάζας-φόρτισης και ο ανιχνευτής λαμβάνει ένα σήμα ιόντος ανάλογο με τη συγκέντρωση.

1.5.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.5.3.1 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) αποτελεί την ευρύτερα χρησιμοποιούμενη χρωματογραφική τεχνική. Ο κύριος λόγος είναι η μεγάλη ποικιλία στατικών και κινητών φάσεων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, με

αποτέλεσμα η μέθοδος να είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί σε ευρύτατο πεδίο εφαρμογών των Επιστημών Υγείας, Διατροφής, Περιβάλλοντος, Βιοτεχνολογίας, κ.λπ. Ανάλογα με το είδος της στήλης που χρησιμοποιείται, ο μηχανισμός μπορεί μεταξύ άλλων να είναι:

-Προσρόφηση: Χρησιμοποιείται στήλη που περιέχει υλικό με μεγάλες προσροφητικές ικανότητες, με το οποίο τα πολικά μόρια αλληλεπιδρούν ισχυρά και αργούν να εξέλθουν από την στήλη.

-Κατανομή: Όταν το υλικό της στατικής φάσης έχει καλυφθεί από ένα υγρό που δεν αναμιγνύεται με την κινητή φάση, οπότε πραγματοποιείται μια κατανομή των ουσιών του μίγματος μεταξύ των δυο υγρών. Όταν η στατική φάση είναι πολική και η κινητή φάση είναι μη πολική η χρωματογραφία ονομάζεται κανονικής φάσεως, ενώ σε αντίθετη περίπτωση ονομάζεται αντιστρόφου φάσεως.

-Ανταλλαγή Ιόντων: Η στατική φάση φέρει ιονισμένες ομάδες (θετικές ή αρνητικές) που μπορούν να ανταλλάξουν αντίθετα φορτισμένα ιόντα με τα συστατικά του μίγματος. Χρησιμοποιείται κυρίως για διαχωρισμούς αμινοξέων.

-Αποκλεισμός μεγέθους: Η χρωματογραφία αυτή διαχωρίζει τα μόρια με βάση το μοριακό τους βάρος με την βοήθεια των ειδικών πόρων και αργούν να εξέλθουν της στήλης, σε αντίθεση με τα μεγάλα μόρια που δεν χωρούν μέσα στους πόρους και εξέρχονται γρήγορα.

-Συγγένεια: Ο διαχωρισμός γίνεται με βιοχημικές αλληλεπιδράσεις τύπου αντιγόνου-αντισώματος,

Ο χρόνος ανάλυσης ενός συστατικού του μίγματος που διαχωρίζεται με HPLC εξαρτάται από τους εξής παράγοντες :

- Την χημική δομή του συστατικού και η αλληλεπίδραση του με το υλικό της στήλης.
- Την χημική σύνθεση και το pH της κινητής φάσης.
- Τον ρυθμό ροής της κινητής φάσης.

- Την θερμοκρασία

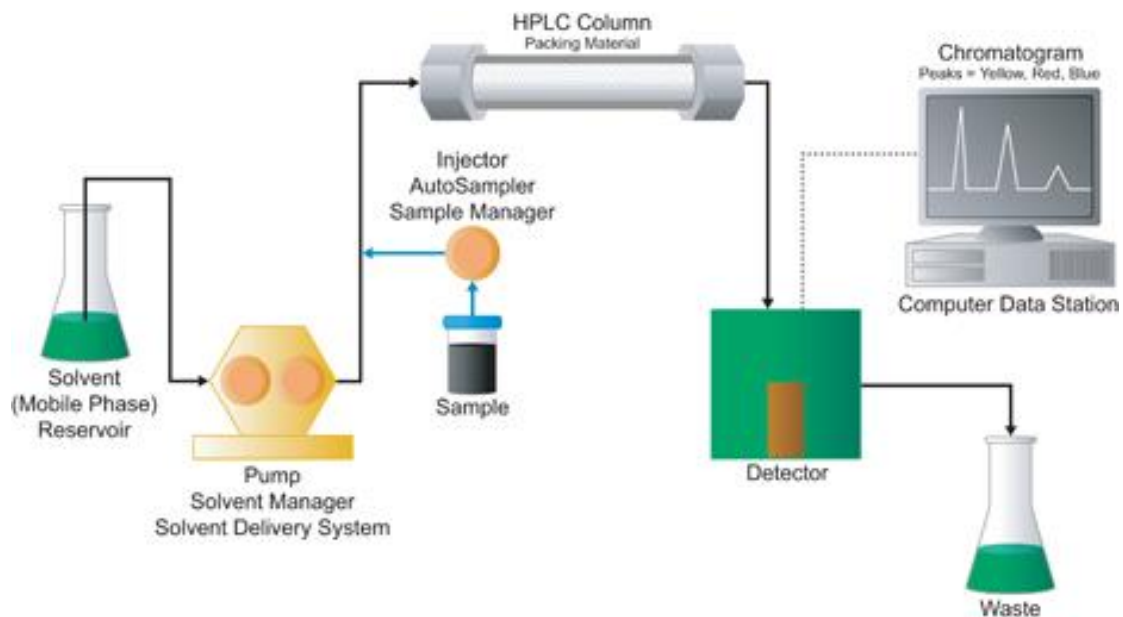
-

Προφανώς, ο χρόνος έκλουσης του κάθε συστατικού του μίγματος επηρεάζεται με διαφορετικό τρόπο από τους παραπάνω παράγοντες. Επομένως, με κατάλληλη ρύθμιση ενός ή περισσοτέρων από τους παραπάνω παράγοντες μπορούμε να επιτύχουμε τον διαφορετικό χρόνο έκλουσης των συστατικών ενός μίγματος και επομένως τον διαχωρισμό τους.

ΣΥΝΟΠΤΙΚΑ ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ HPLC

- Μεγαλύτερο πεδίο εφαρμογών από όλες τις χρωματογραφικές τεχνικές.
- Δυνατότητα ανάλυσης ακόμα και θερμοευαίσθητων ενώσεων.
- Μεγάλη ποικιλία στατικών φάσεων αρα και μεγαλύτερες δυνατότητες διαχωρισμού διαφορετικών κατηγοριών (π.χ. ιόντα, μακρομόρια)
- Μεγάλη ποικιλία εκλογής κινητής φάσης μέσω διαφόρων συνδυασμών (π.χ. ρυθμιστικά διαλύματα διαφορετικών τιμών pH, προσθήκη άλλων ενώσεων, οργανικών διαλυτών, κ.λ.π.) σε σχέση με τα αέρια που χρησιμοποιούνται ως κινητή φάση στην αέρια χρωματογραφία.
- Παρουσιάζει την μεγαλύτερη δυνατότητα χρήσης της για απομόνωση και παραλαβή ενώσεων από φυσικά μίγματα (π.χ. σπανίων μετάλλων από διαλυτοποιημένα ορυκτά, φυτικών ουσιών από εκχυλίσματα).

Στο σημείο αυτό πρέπει επίσης να αναφέρουμε και ορισμένα μειονεκτήματα της HPLC όπως η μικρότερη διαχωριστική ικανότητα σε σχέση με την αέρια χρωματογραφία και συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεθόδους έχει το υψηλότερο σχετικό κόστος.



Εικόνα 7: Διάγραμμα ροής της HPLC [23]

Η υγρή χρωματογραφία (LC) είναι μια εξαιρετικά ευέλικτη τεχνική με πολλά πλεονεκτήματα :

- τόσο η στατική φάση όσο και η κινητή φάση μπορεί να μεταβληθεί για να επιτευχθεί ο επιθυμητός διαχωρισμός
- διαχωρισμοί μπορεί να ενισχυθούν περαιτέρω με την προσθήκη προσθέτων (χημικό παράγοντα, αντιδραστήρια σχηματισμού ζεύγους ιόντων , επιφανειοδραστικά) στην κινητή φάση ,
- διαχωρισμοί μπορεί να ενισχυθούν με την αλλαγή της κινητής φάσης κατά τη διάρκεια της ανάλυσης (βαθμωτή έκλυση) ,
- μια μεγάλη ποικιλία από στατικές φάσεις διατίθενται στο εμπόριο βασίζεται σε μια πλούσια ποικιλία από αρχές διαχωρισμού , όπως

η χρωματογραφία κανονικής φάσης (NPC)

η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RPC)

η αντίστροφης φάσης χρωματογραφία ζεύγους ιόντων (IPC)

η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων (IEC)

η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC) .

- Συνήθως απαιτείται ελάχιστη προετοιμασία του δείγματος.

1.5.4 Η ΜΕΘΟΔΟΣ HPLC- ICP- MS

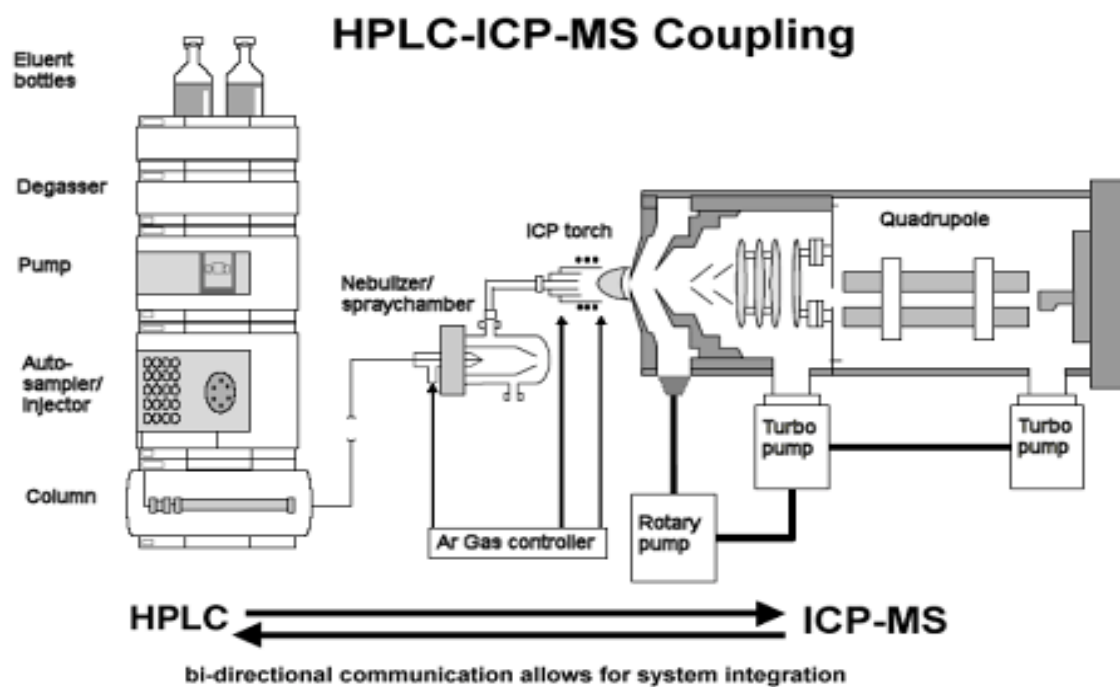
Η σύζευξη υψηλής απόδοσης υγρής χρωματογραφίας με την φασματομετρία μάζας με διεγερση πλάσματος αποτελεί μέθοδο εκλογής για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό διαφορετικών ειδών του ίδιου στοιχείου (ειδοταυτοποίηση)

Απο την πλευρά της χρωματογραφίας τα μεγάλα οφέλη της σύζευξης HPLC-ICP-MS είναι:

- i. Η εφαρμογή ενός ολικού ανιχνευτή (universal detector)
- ii. Η μεγάλη ευαισθησία της τεχνικής
- iii. Η μεγάλη εκλεκτικότητα της μεθόδου (απόλυτη ταυτοποίηση)
- iv. Η δυνατότητα ταυτοποίησης άγνωστων ενώσεων σε άγνωστα δείγματα.

Απο την πλευρά της ICP-MS τα οφέλη είναι:

- i. Η άμεση εισαγωγή μη πτητικών ενώσεων χωρίς την ανάγκη τροποποίησης του μορίου της προσδιοριζόμενης ένωσης
- ii. Η εκμετάλλευση της υψηλής διαχωριστικής ικανότητας της υγρής χρωματογραφίας
- iii. Ο περιορισμός ανεπιθύμητων φαινομένων (π.χ. μείωση της απόδοσης ιοντισμού λόγω επίδρασης υποστρώματος) λόγω της κλασματοποίησης περίπλοκων δειγμάτων.



Εικόνα 8: Σύζευξη HPLC-ICP-MS [23]

1.6 ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Μια σειρά παλαιότερων ερευνών έδειξε ότι διάφορα είδη Μn συναντώνται στον ανθρώπινο ορό και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CSF) [40,43]. Στον ορό το Μn που βρέθηκε, συνδέεται κυρίως με τις πρωτεΐνες, όπως η τρανσφερίνη και μόνο σε μικρές ποσότητες ως κιτρικό Μn, ενώ αντίθετα στον CSF βρέθηκαν είδη Μn κυρίως χαμηλού μοριακού βάρους (LMM) εκ των οποίων το Μn-κιτρικό

αναγνωρίστηκε ως το πιο σημαντικό. Αυτά τα ευρήματα ήταν σύμφωνα με άλλες έρευνες που παρουσίαζαν τον LMM Mn-φορέα προς τον εγκέφαλο, ανεξάρτητο από την τρανσφερρίνη [44,45]. Επιπλέον οι Further, Yokel [37] και Aschner [39] βρήκαν ότι το κιτρικό-Mn μεταφέρεται σε αυξημένα ποσοστά σε όλα το νευρικό σύστημα, σύμφωνα με πειράματα αιμάτωσης του εγκεφάλου που πραγματοποίησαν σε αρουραίους.

Συγκεκριμένα, έρευνες από το 2013 [46], αποκάλυψαν ενδεχομένως το κατάλληλο μέσο για την παρακολούθηση των επιπέδων του Mn. Η συνολική συγκέντρωση Mn(S) και Mn(CSF) και στις δύο περιπτώσεις έδειξαν σαφείς συσχετισμούς με τη συγκέντρωση της Mn-τρανσφερίνης, αρκεί το ολικό Mn να παραμένει σε φυσιολογικές τιμές, χαμηλού εύρους συγκέντρωσης, δηλαδή κάτω από 1.6 mg/L. Ωστόσο, και οι δύο, η συνολική Mn (S) και Mn (CSF) συσχετίζεται με την συγκέντρωση Mn-κιτρικού στον ορό (Mn-Cit (S)), όταν η συνολική Mn (S) υπερβαίνει τα 1.6 mg /L. Αυτή η σύνδεση μεταξύ συνολικής Mn (CSF) και Mn-Cit (S) σε αυξημένη συγκέντρωση Mn στον ορό είναι ιδιαίτερα σημαντική, επειδή - σε αντίθεση με τον ορό - το CSF είναι σπάνια διαθέσιμο (μόνο μετά από σοβαρές νευρολογικές ενδείξεις προτείνεται από νευρολόγους η παραλή του) .

Στο Helmholtz Zentrum München και συγκεκριμένα στο Ινστιτούτο Οικολογικής Χημείας έχουν γίνει μέχρι σήμερα πολλές έρευνες σχετικά με την ειδοαυτοποίηση μαγγανίου σε βιολογικά δείγματα. Μέχρι σήμερα οι περισσότερες μέθοδοι ειδοαυτοποίησης του Mn γίνονται διότι έχει παρατηρηθεί πως στις μέρες μας ένας μεγάλος αριθμός ασθενών πάσχουν από νευρολογικές ασθένειες όπως Parkinson και Alzheimer ,οι οποίες είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με την παρουσία μαγγανίου στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι μέθοδοι ταυτοποίησης μαγγανίου σε δείγματα ορού αίματος και υγρού μυελού τον οστών που έχουν χρησιμοποιηθεί ως τώρα είναι η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση σε σύνδεση με την φασματομετρία μάζας με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (CZE-ICP-MS) και η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους σε σύνδεση και παλι με την φασματομετρία μάζας με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα(SEC-ICP-MS). Οι συγκεκριμένες έρευνες περιγράφηκαν από τους Michalke, Κλουδα και Μιστριώτη [28,29,68,69]. Αυτοί οι συγγραφείς κατέδειξαν την ανάγκη ανάπτυξης αναλυτικών μεθόδων για την ανίχνευση του μαγγανίου

στα βιολογικά δείγματα, βασιζόμενη σε συνδυασμένες χρωματογραφικές τεχνικές με φασματομετρία μάζας.

Ο Nischwitz [30] χρησιμοποιώντας την μέθοδο SEC-ICP-MS κατάφερε να απομονώσει τις χαμηλού μοριακού μεγέθους ενώσεις του μαγγανίου με την χρήση των δοκιμαστικών σωλήνων υπερδιήθησης και να τις εκτιμήσει ποσοτικά και ποιοτικά.

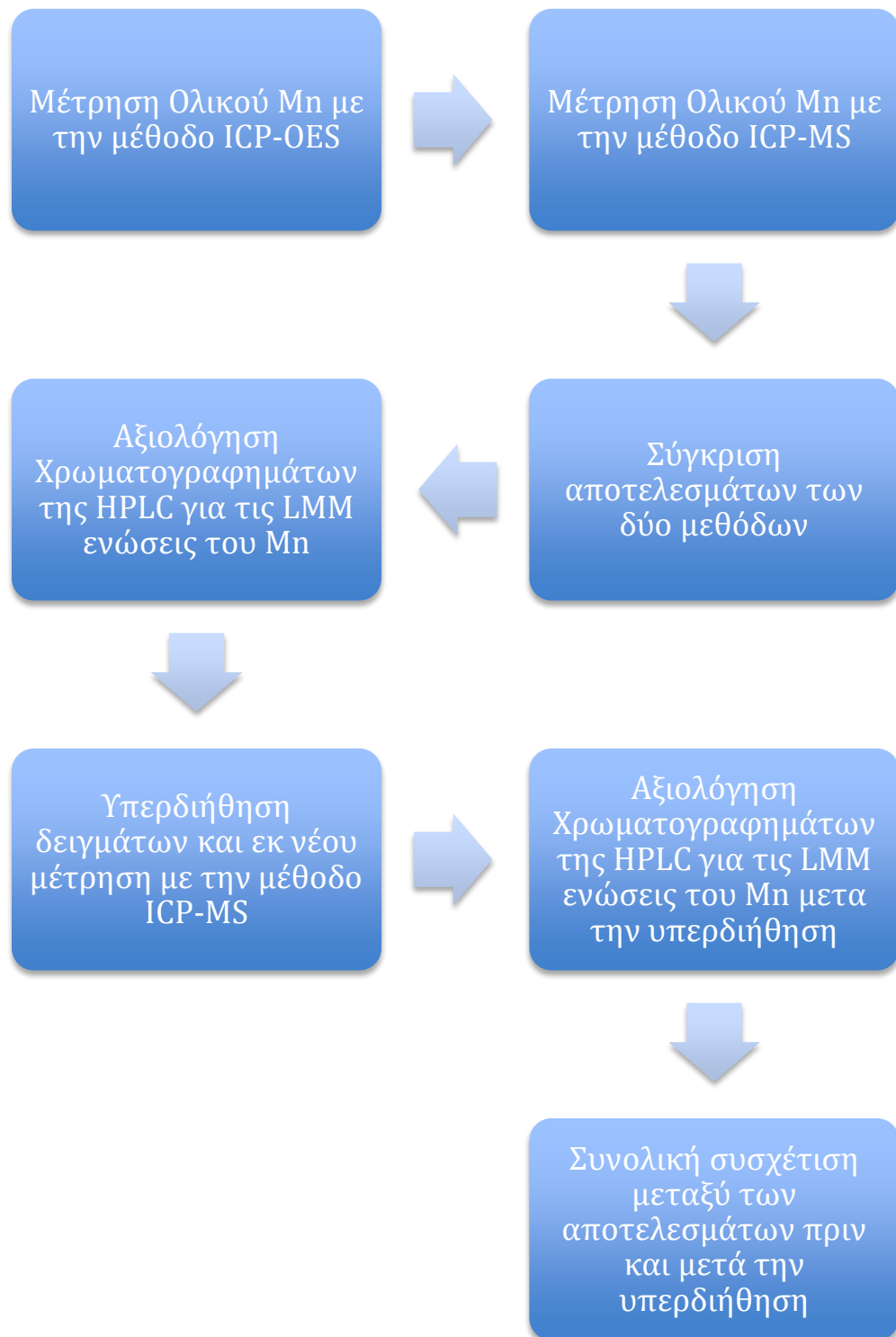
Έχει αναφερθεί ευρέως στη βιβλιογραφία ότι το μαγγάνιο (Mn) σε χαμηλή συγκέντρωση αποτελεί βασικό στοιχείο για τον ανθρώπινο οργανισμό, ωστόσο μετά από αυξημένη έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσει δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία. Η (υπερβολική) έκθεση σε Mn μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση στα βασικά γάγγλια του οργανισμού και ως εκ τούτου μπορεί να προκαλέσει σοβαρές νευρολογικές διαταραχές, μία από τις χειρότερες ο μαγγανισμός, μια ασθένεια με παρόμοια συμπτώματα όπως η νόσος του Πάρκινσον. Όμως, κάποιες νευρολογικές διαταραχές παρατηρήθηκαν ακόμα και σε σημαντικά χαμηλότερες εκθέσεις από εκείνες που σχετίζονταν με τον μαγγανισμό στο παρελθόν [34-39].

Σε περιπτώσεις, όπως η παρούσα εργασία, όπου χρησιμοποιούνται μονάδες υπερδιήθησης 5 kDa και εν συνεχεία προσδιορίζεται το συνολικό Mn, το διήθημα θα μπορούσε να είναι μια πρακτική εναλλακτική λύση, όπως προτείνει ο Nischwitz [30]. Αυτή η απλουστευμένη προσέγγιση υπερδιήθησης LMM από τον ορό, αντιπροσωπεύει μερικώς το Mn-Cit (S). Μια υποχρεωτική προϋπόθεση επιτυχίας αυτής της μεθόδου ωστόσο, είναι ο αυστηρός καθαρισμός του UF-σωλήνα και των φίλτρων, με μια διαδικασία επτά-βημάτων και ο πολύ προσεκτικός χειρισμός για να αποφευχθεί οποιαδήποτε περαιτέρω μόλυνση από Mn. Σε αντίθετη περίπτωση προκύπτουν λανθασμένες/πολύ υψηλές συγκεντρώσεις σε κλάσματα UF του ορού. Σε προκαταρκτικές έρευνες φάνηκε ότι ένα τέτοιο προσεκτικό πρόγραμμα καθαρισμού δεν ήταν πλήρως εφαρμόσιμο στα κοινά εργαστήρια. Ένα κύριο μειονέκτημα είναι ότι παρεμποδίζεται η επαναληψιμότητα και προκύπτει χαμηλή στατιστική συσχέτιση σε συγκεντρώσεις ελάχιστου Mn, δηλαδή κάτω από 1 έως 1,2 mg/L. Ως εκ τούτου, ο στόχος αυτής της εργασίας ήταν να γίνει ένα πρώτο βήμα επιβεβαίωσης των συσχετίσεων που βρέθηκαν στο παρελθόν, σε ένα περιορισμένο αριθμό δειγμάτων από την περιοχή του Μονάχου γεγονός που

αυξάνει σημαντικά τη βάση δεδομένων για αυτές τις συσχετίσεις. Ένα δεύτερο βήμα θα πρέπει να περιλαμβάνει διευκρινίσεις για την αξιοπιστία της υπερδιήθησης υπό πρακτικές συνθήκες για βιοχημικά εργαστήρια. Ειδικά ερωτήματα που πρέπει να απαντηθούν είναι: "προκύπτουν τα ίδια αποτελέσματα από τις δυο μεθόδους», και αν ναι, "κάτω από ποιες συνθήκες";

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ-ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΡΟΗΣ



Σχήμα 1: Διάγραμμα ροής διαδικασίας που ακολουθήθηκε

Ο προγραμματισμός της πειραματικής διαδικασίας περιλαμβάνει 7 κύρια στάδια.

1. **Μέτρηση** και **υπολογισμός** συνολικής συγκέντρωσης μαγγανίου στα 20 δείγματα ορού αίματος με την μέθοδο ICP-OES.
2. **Μέτρηση** και **υπολογισμός** συνολικής συγκέντρωσης μαγγανίου στα 20 δείγματα ορού αίματος και εγκεφαλονωτιαίου υγρού με την μέθοδο ICP-MS.
3. **Σύγκριση** αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων.
4. **Αξιολόγηση των χρωματογραφημάτων** της HPLC στα δείγματα ορού αίματος με έμφαση στην περιεκτικότητα τους σε ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους του μαγγανίου (LMM species) και συσχέτιση με την συνολική συγκέντρωση μαγγανίου.
5. **Υπερδιήθηση** και υπολογισμός συνολικής συγκέντρωσης μαγγανίου στα 20 δείγματα ορού αίματος με την μέθοδο ICP-MS.
6. **Αξιολόγηση των χρωματογραφημάτων** της HPLC μετά την υπερδιήθηση με έμφαση και πάλι στην περιεκτικότητα τους σε χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις του μαγγανίου (LMM species) και συσχέτιση με την συνολική συγκέντρωση μαγγανίου.
7. **Συνολική αποτίμηση** των αποτελεσμάτων όσον αφορά την συγκέντρωση των LMM ενώσεων του μαγγανίου και συσχέτισή τους με την συνολική συγκέντρωση Mn, τόσο πριν όσο και μετά την υπερδιήθηση για την εξαγωγή των τελικών αποτελεσμάτων και συμπερασμάτων .

2.2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων

Μια σειρά 20 δειγμάτων ορού και 20 δειγμάτων εγκεφαλονωτιαίου υγρού, συγκεντρώθηκαν από τους ασθενείς στο Τμήμα Νευρολογίας του Technische Universität München. Αυτά τα δείγματα από τους δότες ήταν απροσδιόριστων νευρολογικών διαταραχών, όπως πονοκέφαλος, ζάλη ή διάφορα άλλα συμπτώματα. Τα δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού συλλέχθηκαν με τυποποιημένη οσφυϊκή παρακέντηση και ο ορός ελήφθη από το αίμα που προέρχεται από την φλέβα της σπονδυλικής στήλης. Μετά ζητήθηκε από τους ασθενείς να συναινέσουν στην χρήση των δειγμάτων για επιστημονικές έρευνες. Τα κατεψυγμένα, αποθηκευμένα δείγματα, αποψύχθηκαν στους 4 °C στο ψυγείο και ήταν έτοιμα για περαιτέρω ανάλυση. Για την παρούσα εργασία εξετάστηκαν ουσιαστικά τα 20 δείγματα ορού αίματος, καθώς τα δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού προορίζονταν για μελλοντική ανάλυση στο εργαστήριο. Παρόλα αυτά, τα 20 δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού μετρήθηκαν με την ICP-MS ως προς την συγκέντρωσή τους σε Mn ώστε να εξεταστεί αν υπάρχει συσχέτιση με αυτά του ορού αίματος.

Για την αύξηση του αριθμού των δειγμάτων και πιο ειδικά για τη σύγκριση του όρου του αίματος με την μέθοδο της υπερδιήθησης συγκεντρώθηκαν δείγματα ορού από τη Σουηδία για να συμπληρωθεί το σύνολο των δειγμάτων για τη μελέτη αυτή. Τα τελευταία δείγματα είχαν συγκεντρωθεί με ανάλογο τρόπο, όπως περιγράφεται παραπάνω, στο Örebro Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο , Τμήμα Επαγγελματικής και Περιβαλλοντικής Ιατρικής (Örebro , Σουηδία).

2.3. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ-ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ

Αναλώσιμα

Σύριγγα μίας χρήσης 1 mL (H.999.1, Roth, Karlsruhe)

Σύριγγα μίας χρήσης 5 mL (0057.1, Roth, Karlsruhe)

Σύριγγα μίας χρήσης 10 mL (0058.1, Roth, Karlsruhe)

Πιπέττες Eppendorf (0,5-10 μL, 10-100 μL, 100-1000 μL, 1-5 mL, πιπέττα πολλαπλών καναλιών 20-300 μL) (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Σωλήνες Υπερδιήθησης (cellulose triacetate , 5 kDa molecular weight cut-off , Sartorius, Germany)

Φιαλίδια δειγμάτων,

4 mL (E155.1, Roth, Karlsruhe) Δοχεία αντίδρασης,

1,5 mL (4190.1, Roth, Karlsruhe) Δοχεία πολλαπλών αντιδράσεων,

0,65 mL (7060.1, Roth, Karlsruhe)

Λογισμικό

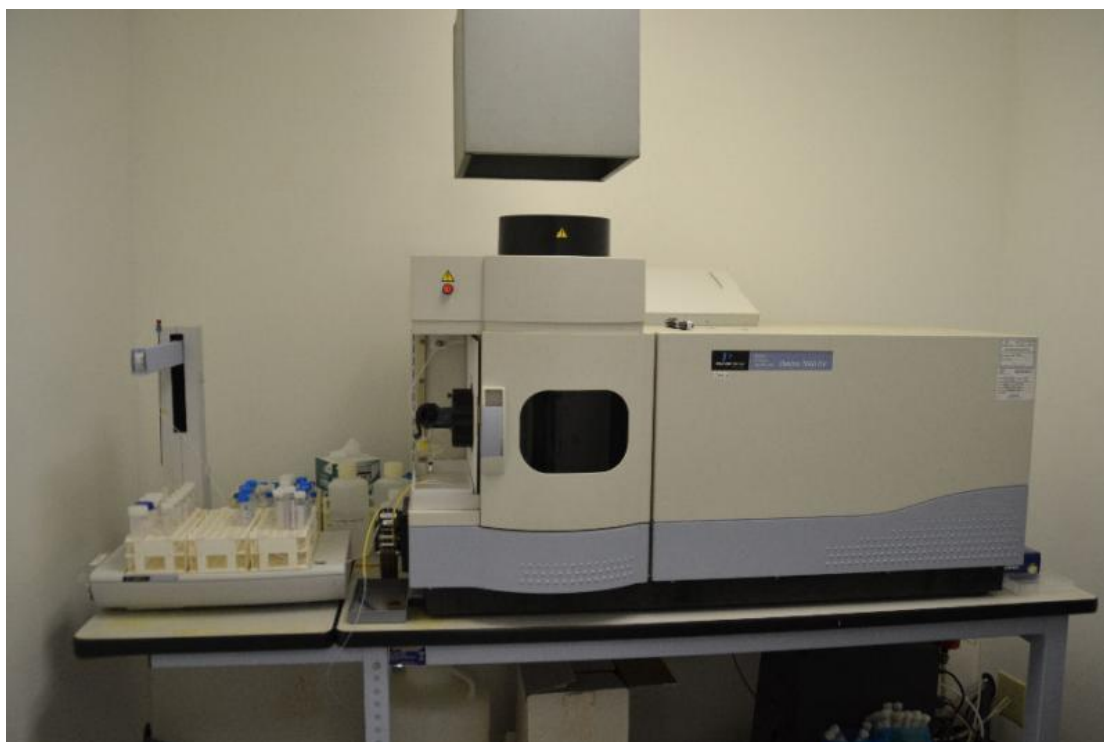
Peakfit 4.1 (Systat Software Inc)

2.4. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

2.4.1 ICP-OES (ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ)

Πίνακας 8: Παράμετροι Λειτουργίας ICP-OES

Measured spectral element	Mn: 257.610 nm
RF Power	1000 W
Plasma gas	15 l Ar/min
Nebulizer gas	600 ml Ar/min



Εικόνα 10: 2011, PERKIN ELMER MDL. OPTIMA 7000DV ICP-OES SYSTEM

2.4.2 ICP-MS (ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ)

Πίνακας 9: Παράμετροι Λειτουργίας ICP-MS

RF Power	1250 W
Nebulizer gas flow	0,94 mL/min
Plasma Gas(Ar)	15L/min
Analog-1700 V	Pulse-950 V
Sweeps/Reading	1

DRC band pass (q)	0.45
Dwell time per 1 min(ms)	350
NH3 gas flow	0.58 mL/min
Analyte	Mn:55



Εικόνα 11: 2011, PERKIN ELMER MDL. NEXION 300X ICP-MS MASS SPECTROMETER

2.4.3 ΣΥΣΚΕΥΗ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗΣ



Εικόνα 12: BIOFUGE 17 RS, HERAEUS SEPATECH, OSTERODE, GERMANY

Η προαναφερθείσα συσκευή φυγοκέντρησης χρησιμοποιήθηκε κατά τον καθαρισμό των δοκιμαστικών σωλήνων υπερδιήθησης σε συνθήκες 4 °C και για ταχύτητες από 1000-2000 στροφές ανά λεπτό.

2.5.ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Στην παρούσα εργασία, όπου διεξάγονται πειράματα ειδοαυτοποίησης σε βιολογικά δείγματα, είναι πιθανό να συμβούν αλλαγές στα είδη λόγω μολύνσεων και προβλημάτων αστάθειας των ειδών κατά την διάρκεια της αναλυτικής διαδικασίας. Για να ξεπεραστούν τα εν λόγω προβλήματα διενεργήθηκαν αρκετές σειρές πειραμάτων. Επιπρόσθετα αποφεύχθηκε η επαφή των δειγμάτων με μεταλλικά μέρη.

2.5.1 ΟΛΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ

ΜΕΘΟΔΟΣ ICP-OES

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του συνολικού μαγγανίου στα 20 δείγματα ορού αίματος χρησιμοποιήθηκε η συσκευή "Optima 7300" (Pelkin Elmer). Η εισαγωγή των δειγμάτων έγινε με ρυθμό 1.0 mL/min και το μετρήσιμο στοιχείο ήταν το Mn:257,610. Κανονικά μετά από 10 μετρήσεις, γινόταν εισαγωγή 3 τυφλών δειγμάτων. Πιο αναλυτικά ελήφθη από 1 mL κάθε δείγματος και αραιώθηκε με διάλυμα Tris-HCL 10 nM, pH 7,4 1:5. Με την μέθοδο αυτή μετρήθηκαν τα 20 δείγματα ορού αίματος για να εξετασθεί αν υπάρχουν σημαντικές αποκλίσεις σε σχέση με τα αποτελέσματα της ICP-MS όσον αφορά τις συγκεντρώσεις ολικού μαγγανίου στα δείγματα.

ΜΕΘΟΔΟΣ ICP-MS

Όπως με την προαναφερθείσα μέθοδο ICP-OES, η συσκευή Nexion (Pelkin Elmer) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του ολικού Mn σε δείγματα ορού αίματος και εγκεφαλονωτιαίου υγρού και σε συνδυασμό με την HPLC έγινε ο προσδιορισμός των LMM ενώσεων του μαγγανίου για τα 20 δείγματα ορού αίματος. Χρησιμοποιήθηκε ισότοπο του Μαγγανίου Mn: 54,9381 amu. Αυτή η παράλληλη μέτρηση τόσο δειγμάτων ορού αίματος όσο και δειγμάτων εγκεφαλονωτιαίου υγρού πραγματοποιήθηκε για να μπορέσει να παρατηρηθούν οι διαφορές που έχουν μεταξύ τους οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων.

2.5.2 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ (LMM species)

Ο διαχωρισμός των ενώσεων του μαγγανίου στα δείγματα ορού αίματος έγινε με την χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) η οποία ήταν συνδεδεμένη σε σειρά με την διάταξη της φασματομετρίας μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος ICP-MS (Inductively coupled plasma mass spectrometry). Ανάλογα με τον χρόνο ανάσχεσης του Μαγγανίου συμπεραίνουμε σε ποιά ένωση αντιστοιχεί σύμφωνα με τις μετρήσεις απο τα αντίστοιχα πρότυπα [42]. Συγκεκριμένα για χρόνο ανάσχεσης 25-32 min το Μαγγάνιο είναι συνδεδεμένο στην α-2 μακρογλομπουλίνη, για 45-48 min στην τρασφερίνη και για 53-58 min στο κιτρικό ιόν. Για την παρούσα εργασία η έρευνα εστιάζεται στις χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις του μαγγανίου (LMM species), οι οποίες συναντώνται για χρόνους ανάσχεσης 48-58 min, που αντιστοιχούν στους υποκαταστάτες τρασφερίνης και κιτρικού. Η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων της HPLC έγινε με το λογισμικό Peak Fit και εξήχθησαν τελικά συμπεράσματα ως προς το ποσοστό που καταλαμβάνουν τα LMM species σε σχέση με την ολική συγκέντρωση μαγγανίου.

2.5.3 ΥΠΕΡΔΙΗΘΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Τα δείγματα ορού αίματος προορίζονται να εισαχθούν σε δοκιμαστικούς σωλήνες υπερδιήθησης. Πριν εισαχθούν τα δείγματα ακολουθήθηκε προσεκτική μέθοδος καθαρισμού των δοκιμαστικών σωλήνων. Ο λόγος για τον οποίο κρινόταν αναγκαία αυτή η διαδικασία ήταν για να εξαλειφθούν τυχόν μολύνσεις των δειγμάτων απο ίχνη μαγγανίου τα οποία είναι πολύ πιθανό να βρίσκονται ήδη μέσα στους δοκιμαστικούς σωλήνες. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε κατα τον καθαρισμό των δοκιμαστικών σωλήνων περιγράφεται στα ακόλουθα 7 βήματα:

ΒΗΜΑΤΑ 1-3

Ο εσωτερικός σωλήνας δειγματοληψίας αφαιρείται και βυθίζεται 3 φορές σε διάλυμα 3 mL 0,5% HNO₃. Στη συνέχεια ανακινείται καλά για 5 λεπτά και τέλος αποστραγγίζεται όλο το περιεχόμενο.

ΒΗΜΑ 4

Εισάγονται 2 mL 0.5% HNO₃ σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και γίνεται φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 1000 στροφές/λεπτό, θερμοκρασία 4 βαθμών, για 5 λεπτά. Για κάθε ένα από τους δοκιμαστικούς σωλήνες το εναπομείνον υγρό αποστραγγίζεται κατά το τέλος του βήματος αυτού.

ΒΗΜΑ 5

Εκ νέου φυγοκέντρηση αυτή την φορά στις 2000 στροφές/λεπτό για 15 λεπτά.

ΒΗΜΑΤΑ 6 και 7

Μετά το πέρας των ανωτέρω βημάτων ο εσωτερικός σωλήνας υπερδιήθησης πληρώνεται με απιονισμένο νερό, εν συνεχεία ανακινείται καλά και τέλος αποστραγγίζεται το περιεχόμενό του.

Για να διαπιστωθεί πως έχει επιτευχθεί επιτυχής καθαρισμός των σωλήνων υπερδιήθησης, το περιεχόμενο αποστράγγισης κάθε βήματος οδηγείται για μέτρηση ως προς την συγκέντρωσή του σε μαγάνιο με την τεχνική ICP-MS. Η συγκεκριμένη διαδικασία λόγω της ευαισθησίας των μετρήσεων πραγματοποιήθηκε παραπάνω από μια φορές σε ορισμένες περιπτώσεις, ώστε να υπάρχει όσο το δυνατόν λιγότερη πιθανότητα μόλυνσης από υπολείμματα Mn στους σωλήνες υπερδιήθησης.

2.5.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΥΠΕΡΔΙΗΘΗΣΗ

Μετά τον επιτυχή καθαρισμό των σωλήνων υπερδιήθησης τα 20 δείγματα ορού αίματος οδηγούνται για μέτρηση της συνολικής συγκέντρωσης μαγγανίου με την μέθοδο ICP-MS.

2.5.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΧΑΜΗΛΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΕΝΩΣΕΩΝ (LMM species) ΤΟΥ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΥΠΕΡΔΙΗΘΗΣΗ

Ακριβώς με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.5.2, με επεξεργασία των χρωματογραφημάτων της HPLC, η οποία ήταν συζευγμένη με την ICP-MS, εξάγονται τελικά συμπεράσματα ως προς το ποσοστό των χαμηλού μοριακού βάρους (LMM species) του μαγγανίου ως προς το συνολικό μαγγάνιο, αυτή την φορά βέβαια, κατόπιν της διαδικασίας υπερδιήθησης. Το κλάσμα των LMM species αντικατοπτρίζει το άθροισμα κιτρικού μαγγανίου και πιθανόν μικρές ποσότητες ανόργανου Mn. Η ανίχνευση του κιτρικού μαγγανίου είναι ιδιαίτερα σημαντική διότι αντιπροσωπεύει το φορτίο του μαγγανίου που μεταφέρεται στο σώμα μέσω του νευρικού συστήματος.

2.5.6 ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΟΥ ΑΚΟΛΟΥΘΗΘΗΚΑΝ

Το τελικό στάδιο της αναλυτικής διαδικασίας περιλαμβάνει συνολική συσχέτιση των αποτελεσμάτων της κάθε μεθόδου, δηλαδή πριν και μετά την υπερδιήθηση. Η έρευνα εστιάζεται στα ποσοστά ανάκτησης των LMM ενώσεων μαγγανίου που επετεύχθησαν πριν και μετά την υπερδιήθηση όσον αφορά τα δείγματα ορού αίματος. Η εξαγωγή των τελικών αποτελεσμάτων γίνεται μόνο για τα δείγματα ορού αίματος καθώς η αποτελεσματικότητα της μεθόδου για αυτή την ομάδα δειγμάτων διερευνάται όπως έχει ήδη αναφερθεί.

2.6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

2.6.1 ΟΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ (ICP-OES)

Η μέση συγκέντρωση του Μαγγανίου στα δείγματα ορού αίματος βρέθηκε να είναι στα $1,08 \pm 0,2$ $\mu\text{g/L}$ ($n=20$ και εύρος $0,76-1,5$ $\mu\text{g/L}$). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων για κάθε δείγμα ορού αίματος παρουσιάζονται στον πίνακα 10. Αξίζει να σημειωθεί,όπως θα αποδειχθεί και στον πίνακα 11, πως η ICP-OES έδωσε παρεμφερή αποτελέσματα με τα αντίστοιχα της μεθόδου ICP-MS.

Πίνακας 10: Συγκέντρωση Mn σε δείγμα ορού αίματος με την μέθοδο ICP-OES

Δείγμα	Συγκέντρωση Mn σε $\mu\text{g/L}$
Serum 456	1.13
Serum 457	1.3
Serum 462	0.89
Serum 495	1.1
Serum 497	1
Serum 498	0.96
Serum 502	1.1
Serum 503	1.06
Serum 505	1.15
Serum 515	0.9
Serum 524	1.2
Serum 526	1.08
Serum 533	1.5
Serum 597	0.88
Serum 566	1.02
Serum 568	0.76
Serum 587	1.3
Serum 599	1.5
Serum 600	0.82
Serum 608	1.04
Average	1.08
σ	0.20

2.6.2 ΟΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ (ICP-MS)

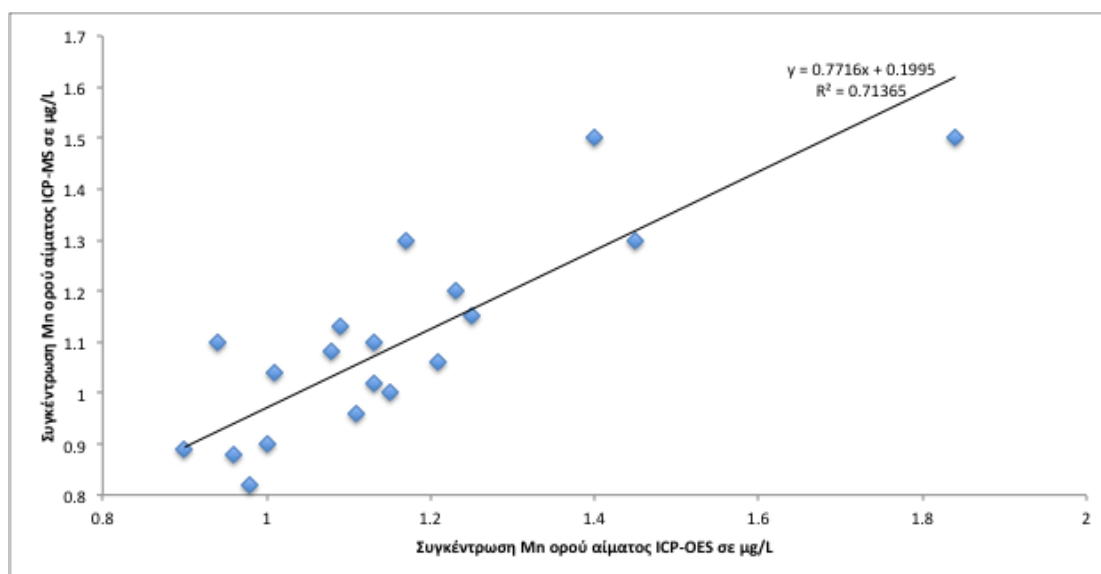
Η μέση συγκέντρωση του Μαγγανίου στα δείγματα ορού αίματος προσδιορίστηκε στα $1,15 \pm 0,22$ $\mu\text{g/L}$ ($n=20$ και εύρος 0,9-1,25 $\mu\text{g/L}$). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων για κάθε δείγμα ορού αίματος παρουσιάζονται στον πίνακα 12.

Πίνακας 11: Συγκέντρωση Mn σε δείγματα ορού αίματος (ICP-MS)

Δείγμα	Συγκέντρωση Mn σε $\mu\text{g/L}$
Serum 456	1.09
Serum 457	1.45
Serum 462	0.9
Serum 495	1.13
Serum 497	1.15
Serum 498	1.11
Serum 502	0.94
Serum 503	1.21
Serum 505	1.25
Serum 515	1
Serum 524	1.23
Serum 526	1.08
Serum 533	1.84
Serum 597	0.96
Serum 566	1.13
Serum 568	0.91
Serum 587	1.17
Serum 599	1.4
Serum 600	0.98
Serum 608	1.01
Average	1.15
σ	0.22

Ακολουθεί γράφημα (πίνακας 12) που απεικονίζει την συσχέτιση που εμφανίζουν μεταξύ τους τα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων σε Mn τα δείγματα ορού αίματος με τις μεθόδους ICP-OES και ICP-MS

Πίνακας 12: Συσχέτιση αποτελεσμάτων για τα δείγματα ορού αίματος ανάμεσα στις δύο μεθόδους ICP-OES και ICP-MS



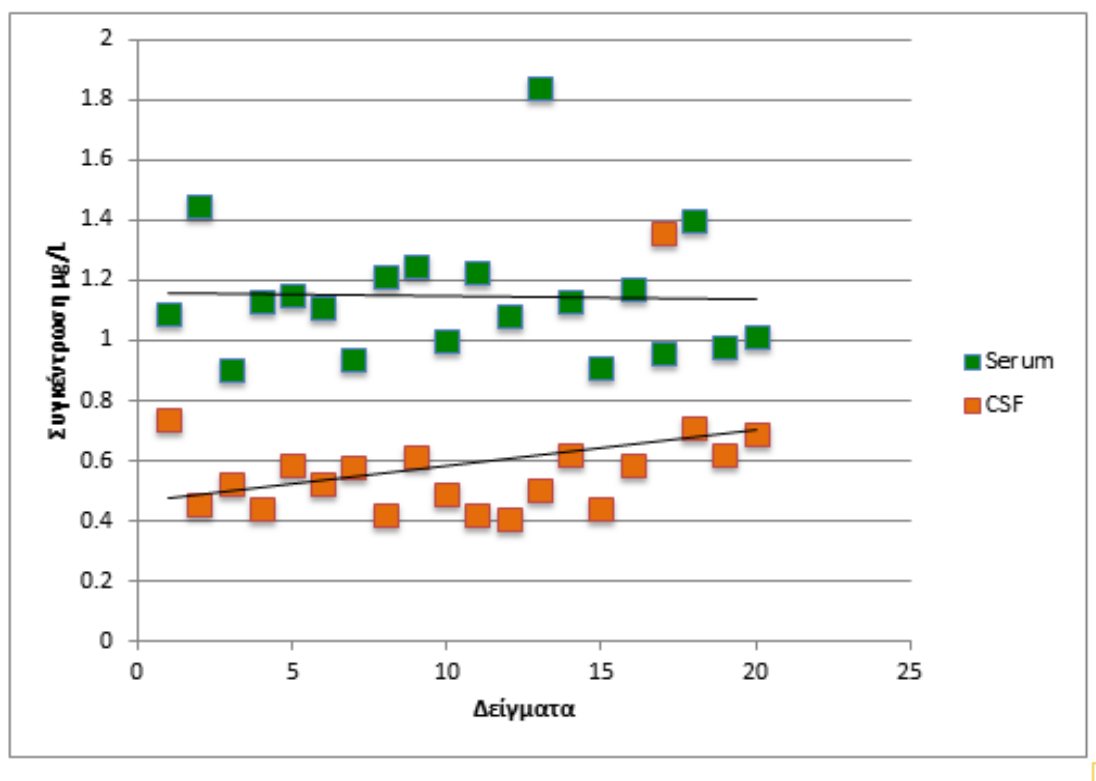
Ο παραπάνω πίνακας εμφανίζει συντελεστή συσχέτισης 0.71365 γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα πως υπάρχει συσχέτιση στα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων στα δείγματα ορού αίματος, μετρημένα με την ICP-OES και την ICP-MS μέθοδο.

Η μέση συγκέντρωση του Μαγγανίου στα δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού προσδιορίστηκε στα $0.59 \pm 0,2$ $\mu\text{g/L}$ ($n=20$ και εύρος $0,41-1,36$ $\mu\text{g/L}$). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων για κάθε δείγμα εγκεφαλονωτιαίου υγρού παρουσιάζονται στον πίνακα 13.

Πίνακας 13: Συγκέντρωση Mn σε CSF (ICP-MS)

Δείγμα	Συγκέντρωση Mn σε $\mu\text{g/L}$
CSF 456	0.74
CSF 457	0.46
CSF 462	0.53
CSF 495	0.44
CSF 497	0.59
CSF 498	0.53
CSF 502	0.58
CSF 503	0.42
CSF 505	0.61
CSF 515	0.49
CSF 524	0.42
CSF 526	0.41
CSF 533	0.51
CSF 568	0.62
CSF 566	0.44
CSF 587	0.58
CSF 597	1.36
CSF 599	0.71
CSF 600	0.62
CSF 608	0.69
Average	0.59
σ	0.20

Στο Σχήμα 1 απεικονίζεται η διαφορά που παρουσιάζουν μεταξύ τους οι συγκεντρώσεις των δυο ομάδων δειγμάτων ως προς τα αποτελέσματα των μετρήσεων της ICP-MS.



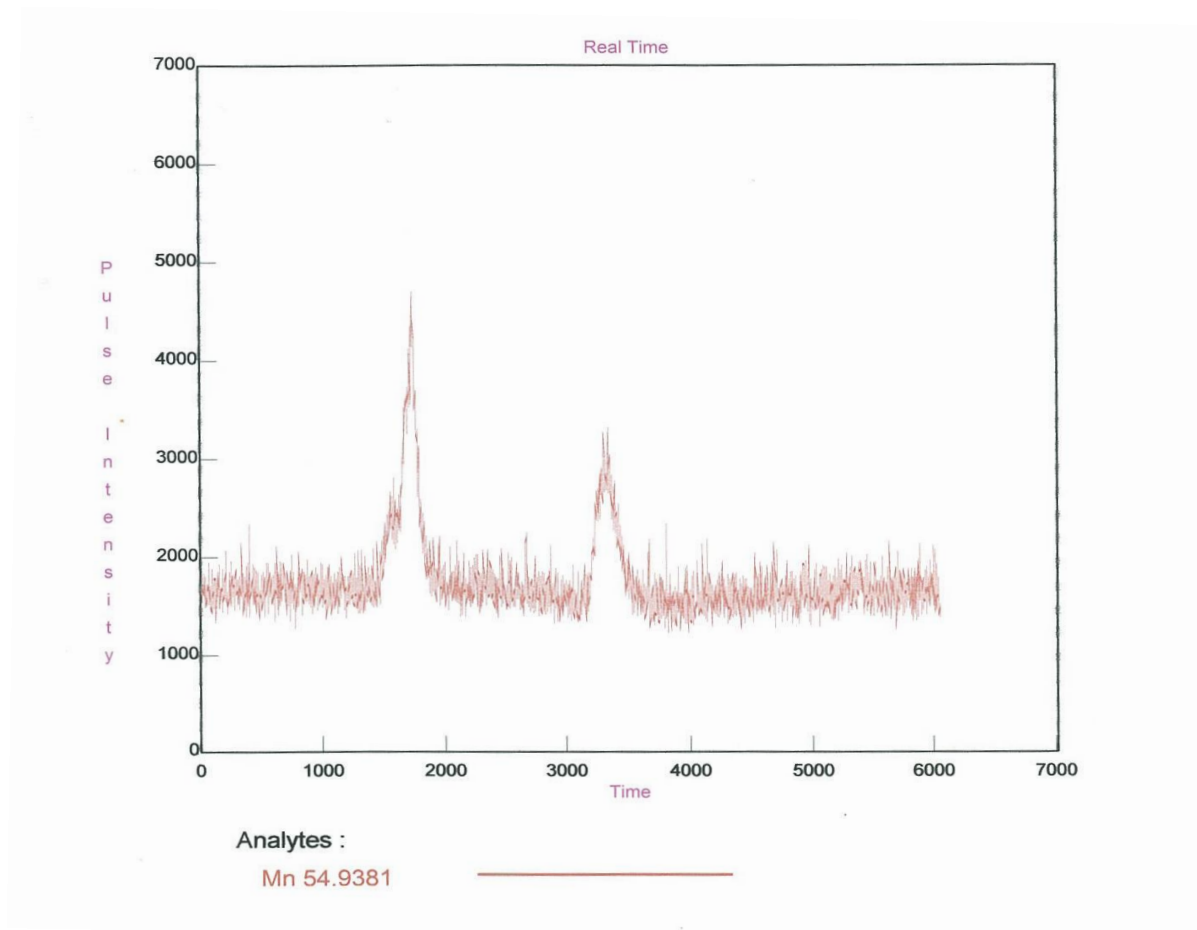
Σχήμα 1: Σύγκριση συγκεντρώσεων ορού αίματος-εγκεφαλονωτιαίου υγρού

Συγκεντρωτικά μπορεί να γίνει η παρατήρηση πως, όσον αφορά την μέθοδο ICP-MS, οι δυο ομάδες δειγμάτων μεταξύ τους εμφανίζουν διαφορά στην διακύμανση των τιμών των συγκεντρώσεών τους. Οι συγκεντρώσεις σε μαγγάνιο των δειγμάτων ορού αίματος είναι κατά μέσο όρο υψηλότερες από εκείνες των δειγμάτων εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Αυτό δικαιολογείται, όπως αναφέρθηκε παραπάνω στην εργασία, καθώς στα δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού το Mn είναι συνδεδεμένο κυρίως με την τρανσφερίνη, ενώ σε αυτά του

ορού αίματος υπάρχουν και σύμπλοκα α-2 μακρογλομπουλίνης, τρανσφερίνης και κιτρικών ιόντων αρα αυτά εμφανίζονται με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.

2.6.3 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ-ΕΙΔΟΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ LMM species

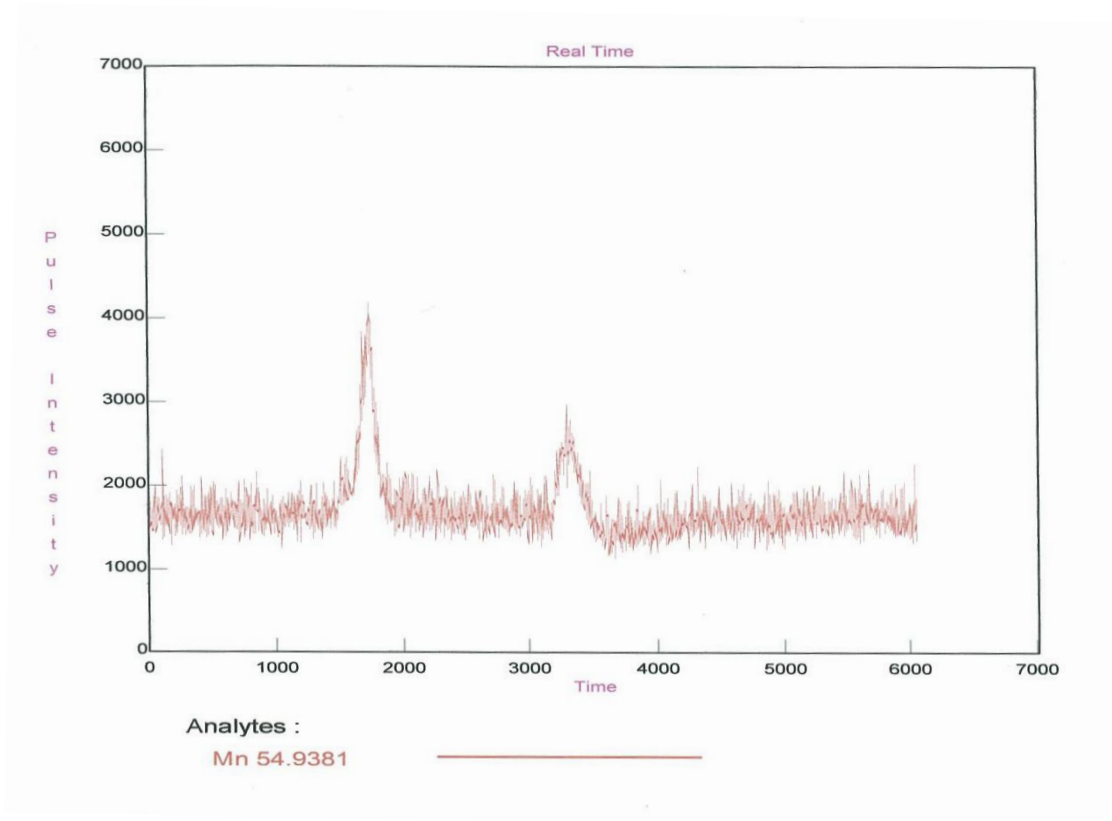
Με βάση τους χρόνους ανάσχεσης των χρωματογραφημάτων απεικονίζεται σε ποια περιοχή το μαγγάνιο βρίσκεται συνδεδεμένο με την α-2 μακροσφαιρίνη, την τρανσφερίνη και το κιτρικό. Οι LMM ενώσεις του μαγγανίου εμφανίζονται για χρόνους ανάσχεσης 3000-3600sec δηλαδή 50-60 min. Παρακάτω ακολουθούν ενδεικτικά τα χρωματογραφήματα από 3 δείγματα ορού αίματος. Στην πρώτη κορυφή, δηλαδή για χρόνο 1200-2000 sec, το μαγγάνιο παρουσιάζει το σύμπλοκο α-2 μακρογλομπουλίνη και στη δεύτερη, για χρόνο 3000-3600 sec το μαγγάνιο είναι συνδεδεμένο στο κιτρικό και την τρανσφερίνη [42].



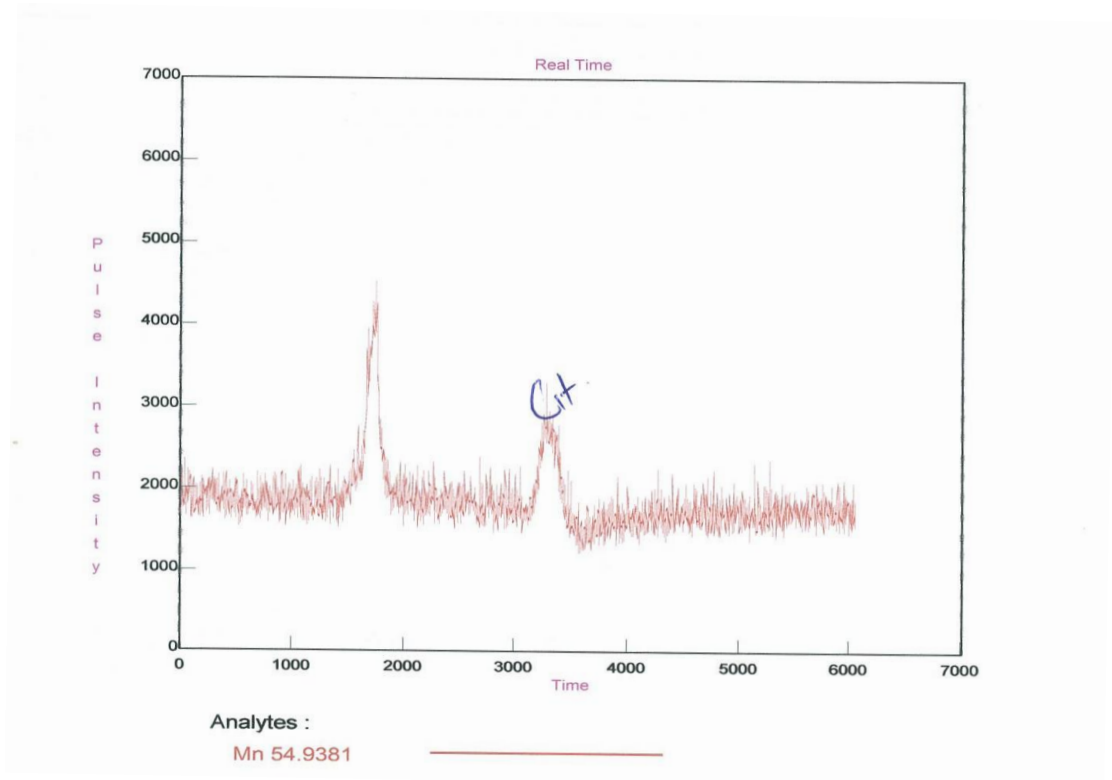
1^η κορυφή: α-2 μακρογλομπουλίνη

2^η κορυφή: κιτρικό και τρανσφερίνη

Σχήμα 2: Χρωματογράφημα δείγματος ορού 497



Σχήμα 3: Χρωματογράφημα δείγματος ορού 502



Σχήμα 4: Χρωματογράφημα δείγματος ορού 498

2.6.4 ΠΟΣΟΣΤΟ ΧΑΜΗΛΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΟ ΟΛΙΚΟ ΜΑΓΓΑΝΙΟ

Απο τα χρωματογραφήματα της HPLC και την συνολική συγκέντρωση μαγγανίου απο την ICP-MS, με χρήση του λογισμικού Peak Fit μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση μαγγανίου που συναντάται στις κορυφές για χρόνους ανάρσεσης 50-60 min, όσον αφορά τα 20 δείγματα ορού αίματος. Ο πίνακας 14 παρουσιάζει τα αποτελέσματα αυτά ενώ ακολουθεί ο πίνακας 15 ο οποίος απεικονίζει το ποσοστό % των χαμηλών μοριακού βάρους ενώσεων μαγγανίου σε σχέση με το ολικό μαγγάνιο που περιέχεται στα δείγματα. Η μέση συγκέντρωση των LMM species σε μαγγάνιο στα δείγματα ορού αίματος προσδιορίστηκε στα $0,56 \pm 0,35$ $\mu\text{g/L}$ ($n=20$ και εύρος 0,06-1,67 $\mu\text{g/L}$). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων για κάθε δείγμα παρουσιάζονται στον πίνακα 14.

Πίνακας 14: Συγκέντρωση χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεων μαγγανίου στα 20 δείγματα ορού αίματος.

Δείγμα	Συγκέντρωση LMM σε $\mu\text{g Mn/L}$
Serum 456	0.11
Serum 457	0.72
Serum 462	0.46
Serum 495	0.73
Serum 497	0.27
Serum 498	0.53
Serum 502	0.44
Serum 503	0.37
Serum 505	0.76
Serum 515	0.55
Serum 524	1.05
Serum 526	0.66
Serum 533	1.67
Serum 597	0.45
Serum 566	0.37
Serum 568	0.71
Serum 587	0.62
Serum 599	0.06
Serum 600	0.40
Serum 608	0.22
Average	0.56
σ	0.35

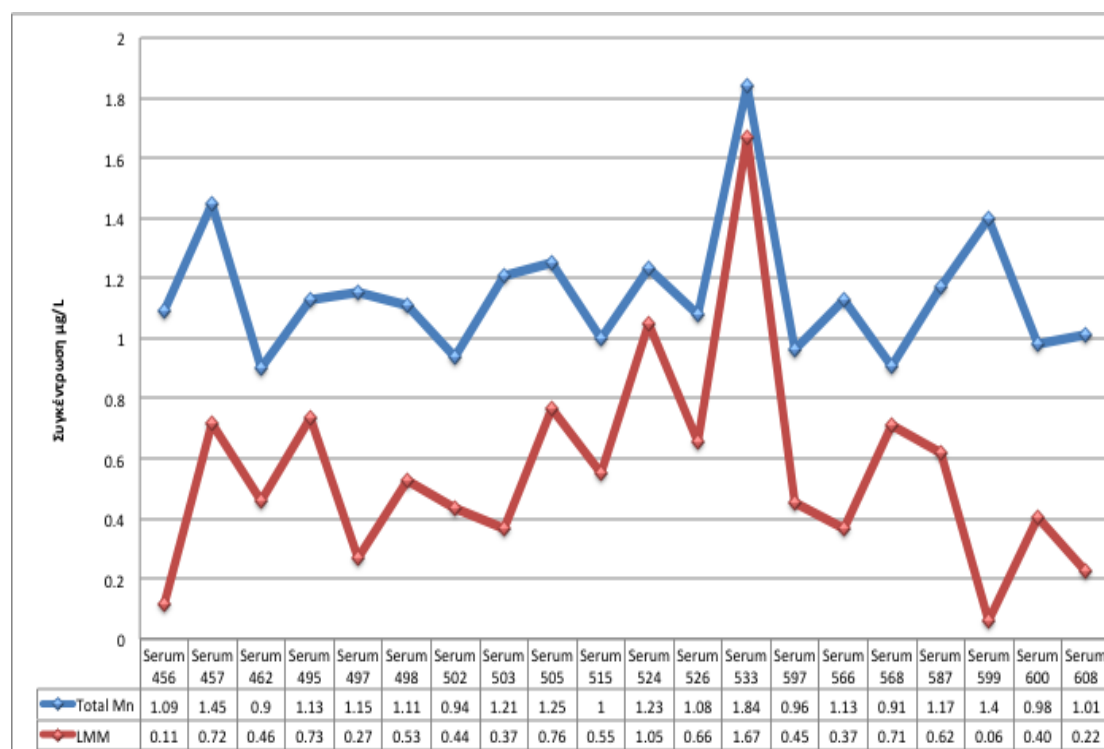
Πίνακας 15: Ποσοστό % των LMM species ως προς το συνολικό Μαγγάνιο.

Δείγμα	Συγκέντρωση LMM % συνολικού Mn
Serum 456	10.52
Serum 457	49.4
Serum 462	50.71
Serum 495	64.91
Serum 497	23.23
Serum 498	47.48
Serum 502	46.38
Serum 503	30.33
Serum 505	61.1
Serum 515	54.91
Serum 524	85.02
Serum 526	60.69
Serum 533	90.73
Serum 597	46.89
Serum 566	32.52
Serum 568	77.87
Serum 587	52.98
Serum 599	4.28
Serum 600	41
Serum 608	22.09
Average	47.65
σ	22.35

Στον πίνακα 15 φαίνεται πως σε διάφορα δείγματα οι ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους αντιπροσωπεύουν ένα εύρος που κυμαίνεται από 4-90% γεγονός που αποδεικνύει την διαφορετικότητα που υπάρχει από ασθενή σε ασθενή. Στους ασθενείς, τα δείγματα ορού αίματος των οποίων παρουσιάζουν αυξημένη συγκέντρωση σε χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις μαγγανίου, τα LMM species δεν έχουν περάσει το φράγμα αίματος-εγκεφαλονωτιαίου υγρού [67]. Αντίστοιχα στα δείγματα στα οποία εμφανίζονται χαμηλές συγκεντρώσεις σε LMM species, αυτές έχουν περάσει πλέον στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Αρα για κάθε ασθενή μπορεί να γίνει μια πρώτη προσέγγιση για την πορεία του

μαγγανίου στον οργανισμό του και να προσδιοριστεί αν το μαγγάνιο έχει περάσει μέσω του φράγματος στον εγκέφαλο. Συγκεντρώσεις τέτοιας τάξεως μπορούν να μας δώσουν πληροφορίες για την παρακολούθηση της διαδρομής του μαγγανίου στον ανθρώπινο οργανισμό.

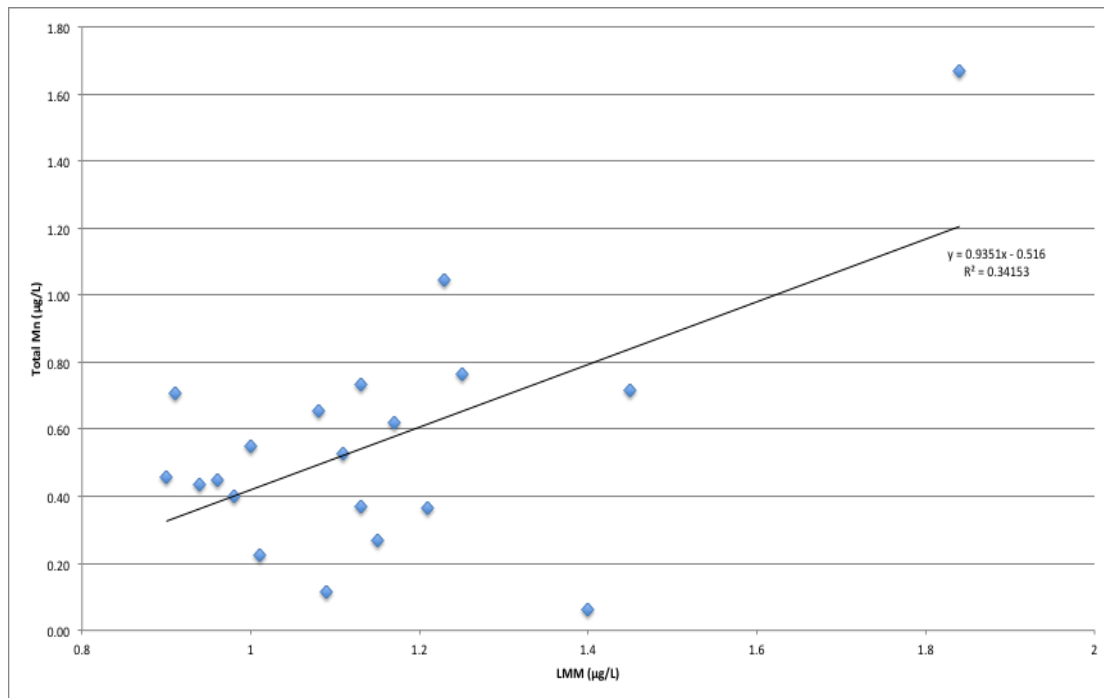
Στο Σχήμα 5 απεικονίζεται γραφικά η ποσόστωση των ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους ως προς την συνολική συγκέντρωση μαγγανίου στα 20 δείγματα ορού αίματος.



Σχήμα 5: Γραφική παράσταση μεταξύ των συγκεντρώσεων του συνολικού Mn και των LMM species.

Στο σχήμα 5 συγκρίνονται οι συγκεντρώσεις ολικού μαγγανίου με αυτές των χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις και παρατηρείται διακύμανση μεταξύ των 20 δειγμάτων που οφείλεται στους παράγοντες που αναλύθηκαν προηγουμένως.

Για την συσχέτιση που βρέθηκε ανάμεσα σε total Mn και LMM species κατασκευάστηκε το ακόλουθο διάγραμμα.



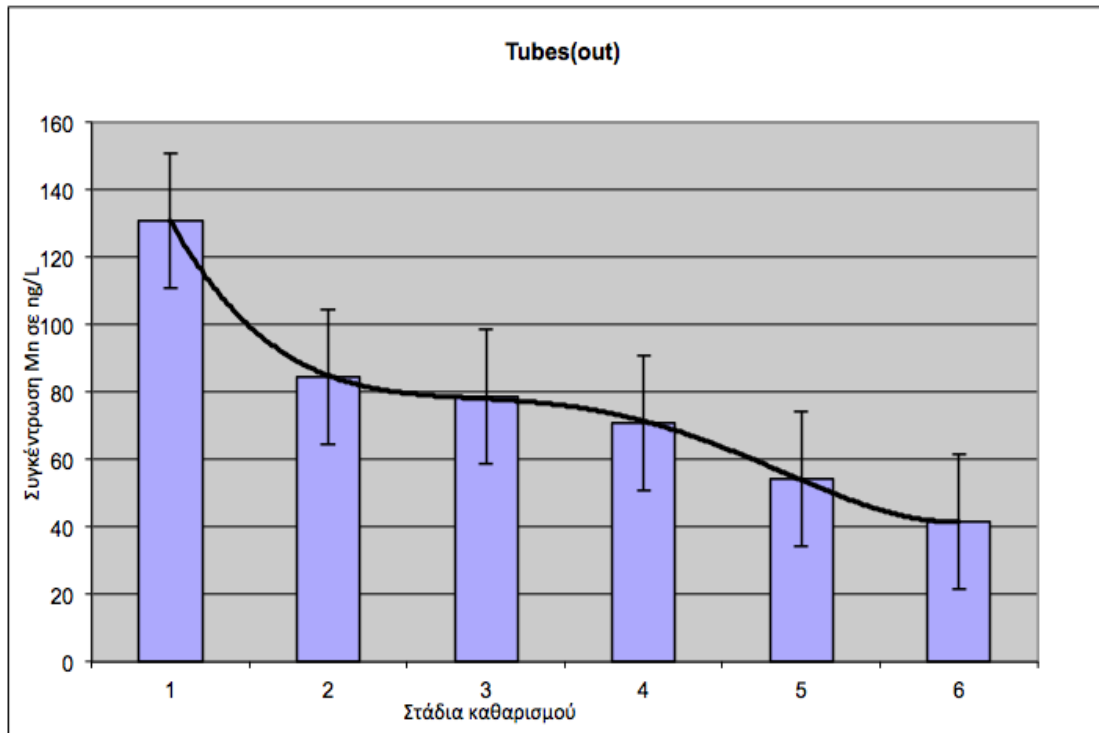
Σχήμα 6: Συσχέτιση total Mn με LMM species

Στο Σχήμα 6 ο συντελεστής συσχέτισης είναι 0.341, γεγονός που μας κάνει να εξαγάγουμε το συμπέρασμα πως δεν υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στο συνολικό μαγγάνιο και τα LMM species κάθε δείγματος. Σε ορισμένα δείγματα βέβαια υπήρχε ποσοστό ανω του 60% γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα πως σε ορισμένα δείγματα το ποσοστό των χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεων αντιπροσωπεύει σχεδόν εξολοκλήρου την συγκέντρωση σε ολικό μαγγάνιο.

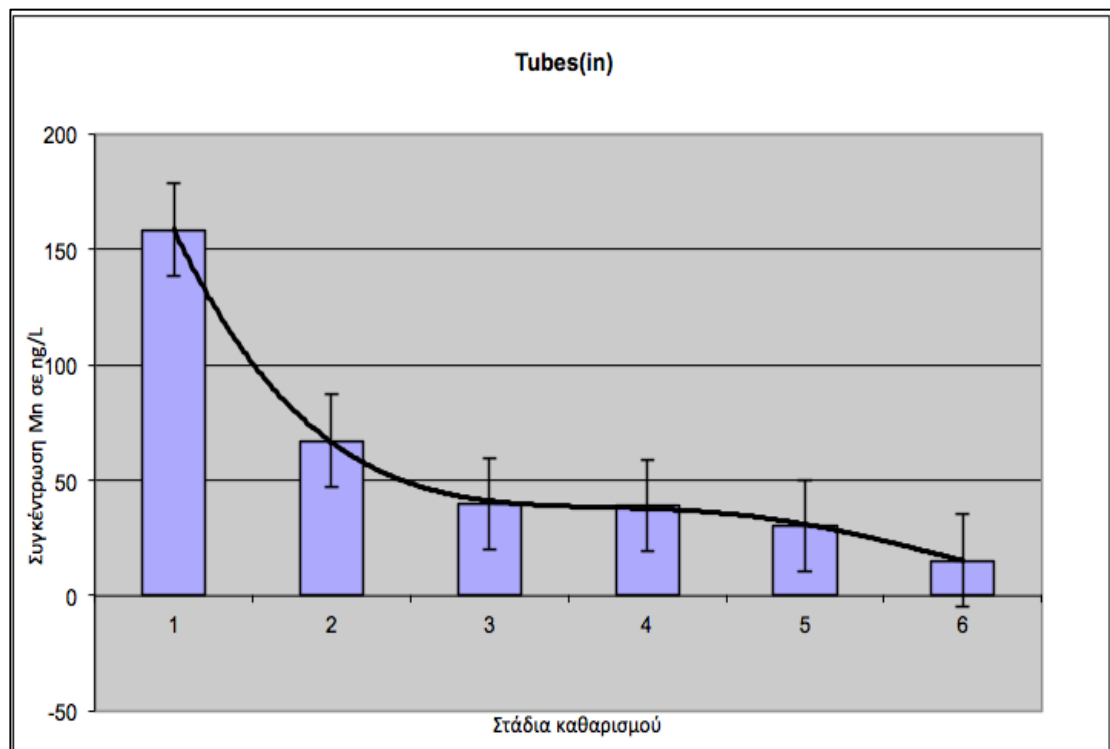
2.6.5 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΣΩΛΗΝΩΝ ΥΠΕΡΔΙΗΘΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΡΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Όπως περιγράφηκε και στην αναλυτική διαδικασία, σημαντικό κομμάτι της εργασίας ήταν ο ενδεδειγμένος και προσεκτικός καθαρισμός των σωλήνων υπερδιήθησης πριν εισαχθούν σε αυτούς τα 20 δείγματα ορού αίματος. Η διαδικασία καθαρισμού τους περιελάμβανε 7 βήματα. Μετά το πέρας κάθε βήματος, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η επιτυχία της διαδικασίας, το περιεχόμενο της αποστράγγισης κάθε βήματος, εισαγόταν για ποσοτικό προσδιορισμό μαγγανίου στην συσκευή ICP-MS. Τα βήματα ακολουθήθηκαν τόσο για το εσωτερικό στέλεχος των σωλήνων υπερδιήθησης (float) όσο και για το εξωτερικό μέρος τους (tube out).

Η διαδικασία και η προόδος των βημάτων καθαρισμού απεικονίζεται στα ακόλουθα σχήματα 7 και 8.



Σχήμα 7: Πρόδος καθαρισμού εξωτερικού μέρους σωλήνα υπερδιήθησης από ίχνη μαγγανίου .



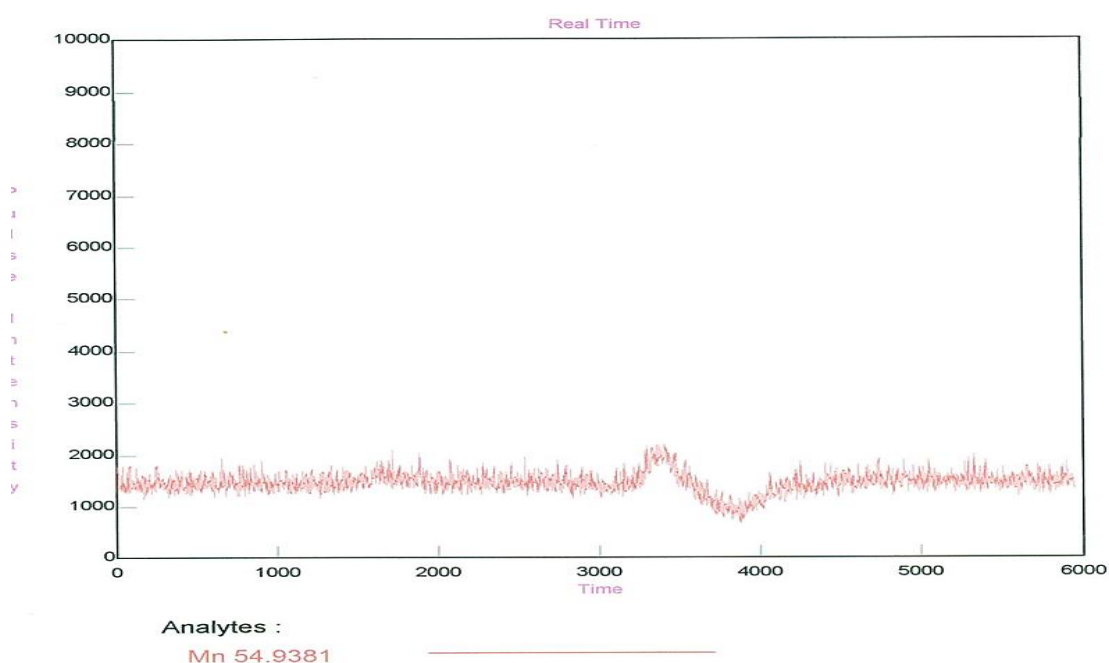
Σχήμα 8: Πρόδος καθαρισμού εσωτερικού μέρους σωλήνα υπερδιήθησης (float) από ίχνη μαγγανίου.

Απο τα σχήματα 7,8 αποδεικνύεται πως με την πάροδο των βημάτων καθαρισμού, η συγκέντρωση μαγγανίου μειώνεται ως ένα σημείο που δεν είναι πλέον καθαρά μετρήσιμη απο την ICP-MS. Στο σημείο αυτο πρέπει να αναφερθεί πως μετά το τελευταίο βήμα καθαρισμού τα αποτελέσματα που μας έδωσε η ICP-MS ήταν πως δεν υπήρχε περαιτέρω μόλυνση και οι σωλήνες είχαν καθαριστεί αποτελεσματικά.

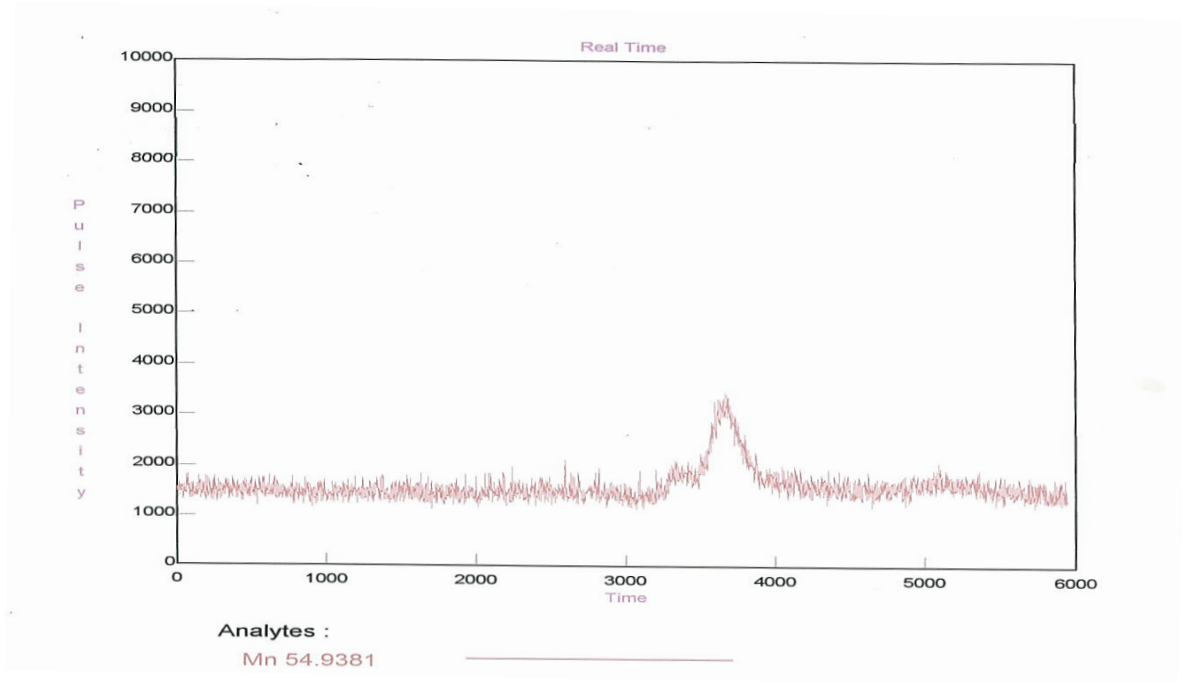
2.6.6 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΧΑΜΗΛΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΥΠΕΡΔΙΗΘΗΣΗ

Τα 20 δείγματα ορού αίματος εισήχθησαν στους σωλήνες υπερδιήθησης (UF) και οδηγήθηκαν για ποσοτικό προσδιορισμό των χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεων κάθε δείγματος με την μέθοδο HPLC-ICP-MS.

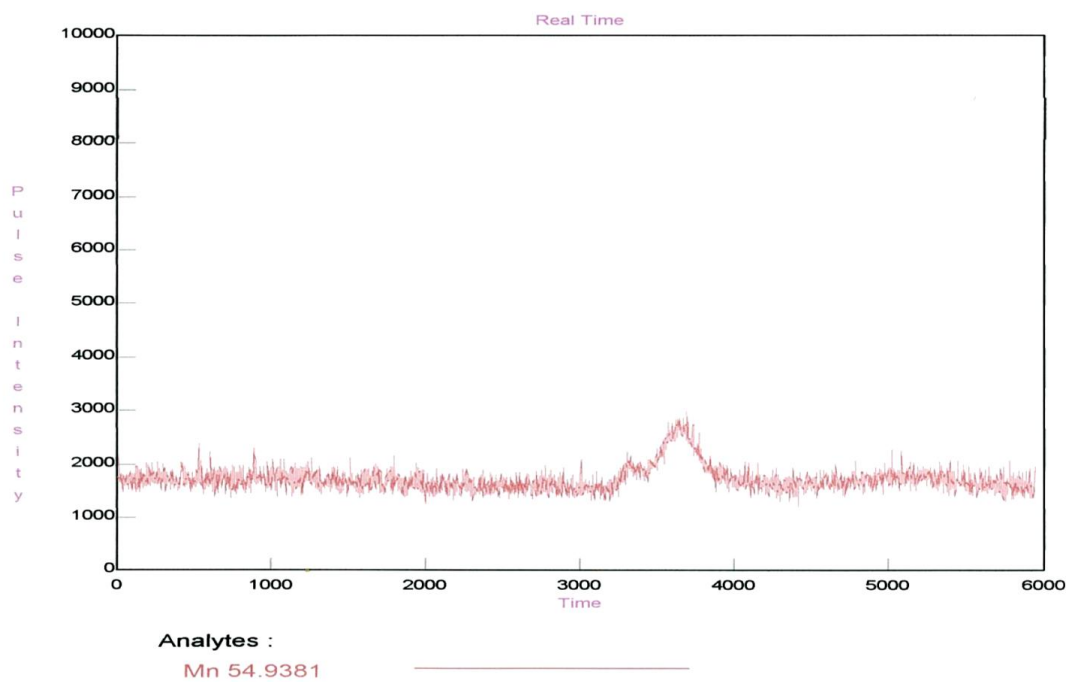
Ακολουθούν ενδεικτικά 3 χρωματογραφήματα απο τις μετρήσεις αυτές.



Σχήμα 9: Χρωματογράφημα Serum 497 μετά την υπερδιήθηση.



Σχήμα 10: Χρωματογράφημα Serum 502 μετά την υπερδιήθηση.



Σχήμα 11: Χρωματογράφημα Serum 498 μετά την υπερδιήθηση.

Απο τα σχήματα 9, 10 και 11 φαίνεται ξεκάθαρα, πως μετά την υπερδιήθηση, η HPLC έδωσε κορυφές μόνο για τις ενώσεις μαγγανίου με χαμηλό μοριακό βάρος, σε χρόνους 3000-3600 sec, γεγονός που αποδεικνύει πως η υπερδιήθηση ήταν επιτυχής και στα δείγματα παρέμειναν μόνο ενώσεις μαγγανίου χαμηλού μοριακού βάρους (Low Molecular Mass) και πιο συγκεκριμένα σύμπλοκα κιτρικού και πιθανόν μικρές ποσότητες ανόργανου Mn.

Όπως και με την διαδικασία που ακολουθήθηκε πριν την υπερδιήθηση, έτσι και τώρα, έχοντας τις κορυφές απο τα χρωματογραφήματα και με χρήση του λογισμικού Peak fit, μπορούν να υπολογιστούν ποσοτικά οι συγκεντρώσεις των χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεων μαγγανίου για κάθε ένα απο τα 20 δείγματα ορού αίματος. Ο πίνακας 16 παρουσιάζει τα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων των δειγμάτων σε μαγγάνιο μετά την υπερδιήθηση. Η μέση συγκέντρωση των LMM species σε μαγγάνιο στα δείγματα ορού αίματος μετά την υπερδιήθηση προσδιορίστηκε στα $0,57 \pm 0,4 \mu\text{g/L}$ ($n=20$ και εύρος $0,06-1,91 \mu\text{g/L}$). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων για κάθε δείγμα παρουσιάζονται στον πίνακα 16, ενώ συγκεντρωτικά αποτελέσματα για τις συγκεντρώσεις των LMM species πριν και μετά την υπερδιήθηση παρουσιάζονται στον πίνακα 17. Να αναφερθεί πως μετά την υπερδιήθηση η συγκέντρωση Mn των χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεων του μαγγανίου στα δείγματα, είναι ουσιαστικά η συγκέντρωση του ολικού Mn που παρέμεινε στα διηθήματα, όπως και θα αποδειχθεί στη συνέχεια.

Πίνακας 16: Συγκέντρωση χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεων μαγγανίου μετά την υπερδιήθηση

Δείγμα	Συγκέντρωση LMM UF σε $\mu\text{g/L}$
Serum 456	0.14
Serum 457	0.47
Serum 462	0.66
Serum 495	0.58
Serum 497	0.27
Serum 498	0.62
Serum 502	0.62
Serum 503	0.42
Serum 505	1.07
Serum 515	0.34
Serum 524	1.04
Serum 526	0.61
Serum 533	1.91
Serum 597	0.41
Serum 566	0.28
Serum 568	0.84
Serum 587	0.57
Serum 599	0.06
Serum 600	0.25
Serum 608	0.32
Average	0.57
σ	0.40

Ο πίνακας 17 παρουσιάζει συγκριτικά τα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων των χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεων πριν και μετά την υπερδιήθηση. Πριν την υπερδιήθηση ο μέσος όρος ήταν $0,56 \pm 0,35$ με εύρος 0.06-1.67 $\mu\text{g/L}$ ενώ μετά την υπερδιήθηση ο μέσος όρος ήταν $0,57 \pm 0,4$ με εύρος 0,06-1,91 $\mu\text{g/L}$.

Πίνακας 17: Συγκριτικά αποτελέσματα των συγκεντρώσεων των LMM species πριν και μετά την υπερδιήθηση.

Δείγμα	Συγκέντρωση LMM UF σε μg/L	Συγκέντρωση LMM σε μg/L
Serum 456	0.14	0.11
Serum 457	0.47	0.72
Serum 462	0.66	0.46
Serum 495	0.58	0.73
Serum 497	0.27	0.27
Serum 498	0.62	0.53
Serum 502	0.62	0.44
Serum 503	0.42	0.37
Serum 505	1.07	0.76
Serum 515	0.34	0.55
Serum 524	1.04	1.05
Serum 526	0.61	0.66
Serum 533	1.91	1.67
Serum 597	0.41	0.45
Serum 566	0.28	0.37
Serum 568	0.84	0.71
Serum 587	0.57	0.62
Serum 599	0.06	0.06
Serum 600	0.25	0.40
Serum 608	0.32	0.22
Average	0.57	0.56
σ	0.40	0.35

Απο τον πίνακα 17 βγαίνει το συμπέρασμα πως πριν την υπερδιήθηση των δειγμάτων, στα LMM species η μεση συγκέντρωση τους σε μαγγάνιο ήταν στα $0,57 \pm 0,4$ μg/L ενώ μετά την υπερδιήθηση των δειγμάτων παρουσιάζονται συγκεντρώσεις των LMM species στα $0,56 \pm 0,35$ μg/L . Οι τιμές αυτές φανερώνουν οτι η συγκέντρωση των χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις πριν και μετά την υπερδιήθηση παραμένουν σταθερές άρα το κλάσμα τους μπορεί να ανακτηθεί απευθείας με την υπερδιήθηση. Η ανησυχία που υπήρχε εστιαζόταν στην περίπτωση που δεν είχε γίνει σωστά ο καθαρισμός των σωλήνων υπερδιήθησης με αποτέλεσμα να υπάρξουν σημαντικές αποκλίσεις μεταξύ των

αποτελεσμάτων. Κατι τέτοιο δεν συνέβη όπως φαίνεται και στον παραπάνω πίνακα.

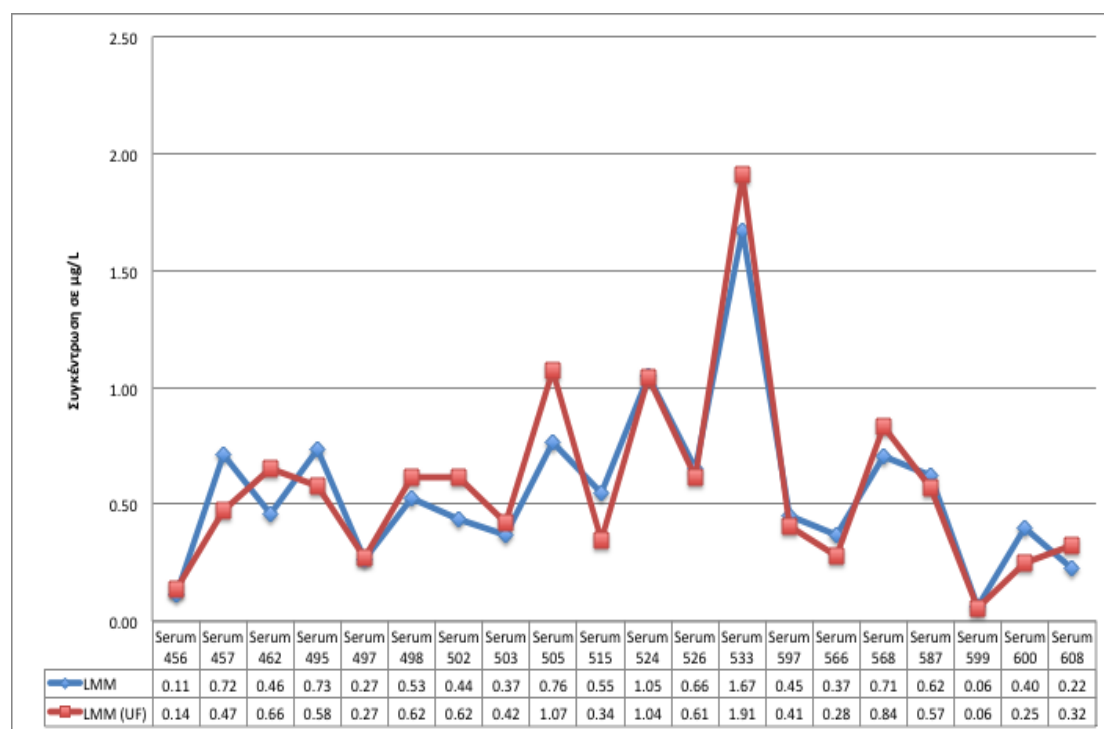
Ο πίνακας 18 παρουσιάζει το ποσοστό % ανάκτησης χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεων του μαγγανίου μετα την υπερδιήθηση, σε σχέση, αυτη τη φορά με το ολικό μαγγάνιο.

Πίνακας 18: Ποσοστό συγκέντρωσης χαμηλου μοριακού βάρους ενώσεων μαγγανίου % σε σχέση με το συνολικο μαγγάνιο μετα την υπερδιηθηση

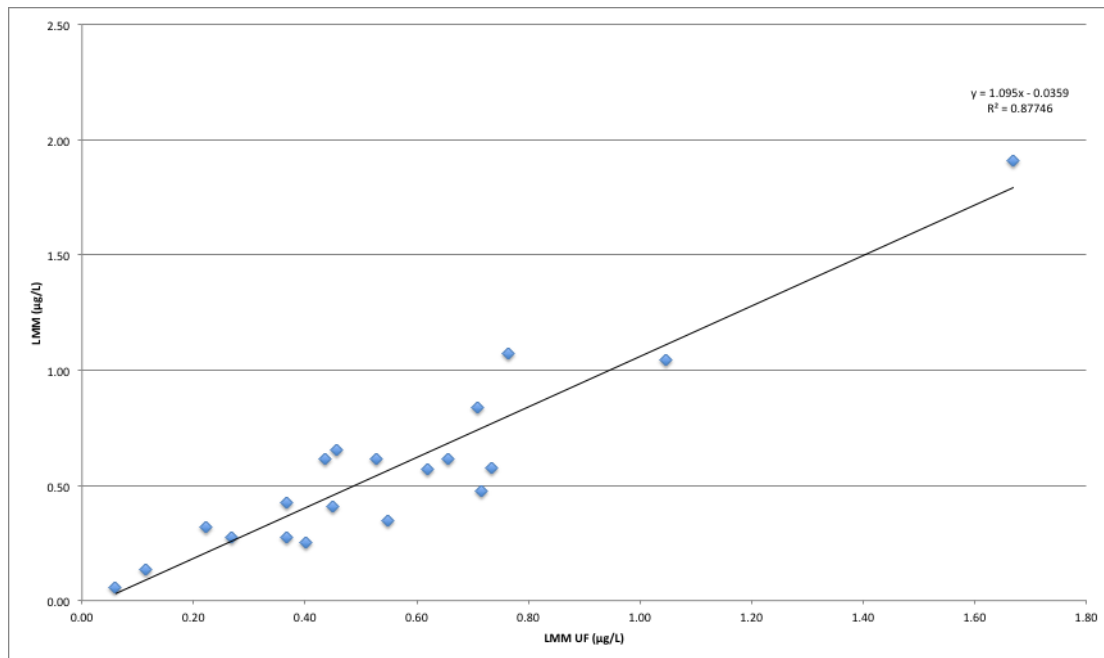
Δείγμα	Συγκέντρωση LMM UF % συνολικού Mn
Serum 456	119.00
Serum 457	66.26
Serum 462	143.79
Serum 495	78.46
Serum 497	102.64
Serum 498	116.74
Serum 502	141.17
Serum 503	115.09
Serum 505	140.69
Serum 515	62.69
Serum 524	99.81
Serum 526	93.55
Serum 533	114.43
Serum 597	90.11
Serum 566	75.37
Serum 568	117.86
Serum 587	92.06
Serum 599	93.84
Serum 600	62.22
Serum 608	143.79
Average	103
σ	26.09

Ορισμένες τιμές ανάκτησης που παρουσιάζονται στον πίνακα 18 υπερβαίνουν το 100%. Στο συγκεκριμένο σημείο και σε συνεννόηση με τον επιβλέποντα καθηγητή στο Μόναχο κ. Michalke, έγινε η παραδοχή πως επειδή οι συγκεντρώσεις εκφράζονται σε $\mu\text{g/L}$, δηλαδή σημαντικά μικρές τιμές, ανακτήσεις στο εύρος 50-150% θεωρούνται αποδεκτές καθώς λαμβάνεται υπόψιν η όποια μόλυνση των δειγμάτων, των σωλήνων υπερδιήθησης ή ακόμη και των συσκευών. Πιο ειδικά, τιμές ανάμεσα στο 66-115% δίνουν μια σαφή εικόνα με βάση την παραδοχή αυτή.

Έτσι, εκτός ορισμένων περιπτώσεων παρουσιάζονται αποτελέσματα που στηρίζουν το σκοπό της εργασίας αυτής. Για να γίνει ακόμα πιο κατανοητό το τελικό συμπέρασμα που εξάγεται, δημιουργήθηκαν τα σχήματα 12 και 13 που απεικονίζουν την σχέσεις των συγκεντρώσεων των LMM species του μαγγανίου των 20 δειγμάτων ορού αίματος, πριν και μετά την υπερδιήθηση.



Σχήμα 12: Σύγκριση συγκεντρώσεων των LMM species μαγγανίου πριν και μετά την υπερδιήθηση.



Σχήμα 13: Συσχέτιση συγκεντρώσεων των LMM species μαγγανίου μετά την υπερδιήθηση.

Το σχήμα 13 παρουσιάζει έναν υψηλό συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0.87746$, που αποδεικνύει πως οι LMM ενώσεις τα μαγγανίου, οι οποίες δίνουν πολλές ουσιαστικές πληροφορίες σχετικά με την διαδρομή του μαγγανίου στον ανθρώπινο οργανισμό και ως βιοδείκτη γενικότερα, μπορούν να προσδιοριστούν απευθείας με την μέθοδο της υπερδιήθησης, με σημαντική ακρίβεια. Διευκολύνεται δηλαδή με αυτό τον τρόπο η έρευνα για την ανίχνευση μαγγανίου σε δείγματα ορού αίματος και ο προσδιορισμός των χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεών του. Τα δείγματα που υπήρχαν διαθέσιμα για την συγκεκριμένη εργασία ήταν συνολικά 20 αλλά αρκετά για να μας δείξουν πως με τον κατάλληλο καθαρισμό των σωλήνων υπερδιήθησης μπορούν να εξαχθούν σημαντικά αποτελέσματα όσον αφορά τις συγκεντρώσεις των LMM species του Μαγγανίου.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Στην εργασία αυτή αποδείχθηκε πως με έναν συγκεκριμένο αριθμό δειγμάτων ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις συνολικού μαγγανίου στον ορό λαμβάνει χώρα μια αλλαγή στους φορείς μαγγανίου προς το κιτρικό. Συνεπώς, ο καθορισμός του κιτρικού μαγγανίου δίνει την ευκαιρία για την εκτίμηση ενός φορτίου μαγγανίου σε ορό αίματος, δηλαδή λειτουργεί ως βιοδείκτης μαγγανίου πέρα από το αιματοεγκεφαλικό φράγμα. Για έναν απλούστερο καθορισμό κιτρικού μαγγανίου στον ορό, η υπερδιήθηση των δειγμάτων θα μπορούσε να είναι μια κατάλληλη επιλογή, π.χ. για ιατρικά εργαστήρια, ωστόσο μόνο όταν υπολογίζονται προσεκτικά οι μεθοδικές προϋποθέσεις και περιορισμοί κυρίως όσον αφορά την διαδικασία καθαρισμού. Σε συνέχεια της έρευνας αυτής που διεξήχθη στο Μόναχο από τον καθηγητή Michalke, με $n=60$ δείγματα ορού αίματος κατέστη ακόμα πιο σαφές πως η μέθοδος που ακολουθήθηκε παραπάνω είχε σημαντικά αποτελέσματα, παρόμοια με της παρούσας εργασίας, γεγονός που αποδεικνύει πως η υπερδιήθηση είναι μια αποτελεσματική μέθοδος ώστε να γίνει απευθείας ανάκτηση των χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεων μαγγανίου συμπεριλαμβανομένου και του κιτρικού. Η ίδια μέθοδος ερευνάται να διεξαχθεί αυτή τη φορά με δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού με απώτερο σκοπό να εξαχθούν τα ίδια συμπεράσματα με αυτά των δειγμάτων ορού αίματος ώστε να μπορέσει να γίνει τελικά μια συνολική συσχέτιση μεταξύ τους. Αυτό θα αποτελούσε πολύ σημαντικό βήμα στην βιοπαρακολούθηση του μαγγανίου καθώς για τον ίδιο ασθενή τα ποιοτικά αποτελέσματα που αφορούν τον ορό αίματος θα είναι πλέον επαρκή και θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε παραπλήσια συμπεράσματα σε σχέση με την ανάλυση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Η σημασία της προοπτικής αυτής στον χώρο της εργαστηριακής ιατρικής στηρίζεται στο γεγονός ότι είναι ιδιαίτερα επίπονο για τον ασθενή να υποβληθεί στην διαδικασία συλλογής δείγματος εγκεφαλονωτιαίου υγρού, σε σύγκριση με τον ορό αίματος που είναι μια πολύ απλουστευμένη διαδικασία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. <http://en.wikipedia.org/wiki/Manganese>
2. <http://www.lenntech.com/periodic/elements/mn.htm>
3. Yocum, C.F, Pecoraro, V (1999) Recent advances in the understanding of the biological chemistry of manganese. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 182–187.
4. <http://www.chemicool.com/elements/manganese.html>
5. <http://www.webmd.com/vitamins-supplements/ingredientmono-182-MANGANESE.aspx?activeIngredientId=182&activeIngredientName=MANGANESE>
6. Whittaker, J.W (2000) Manganese superoxide dismutase. *Met. Ions Biol. Syst.* **37**, 587–611.
7. Christianson, D.W (1997) Structural chemistry and biology of manganese metalloenzymes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **67**, 217–252.
8. Cowan, J.A (2002) Structural and catalytic chemistry of magnesium-dependent enzymes. *Biometals* **15**, 225–235.
9. Maguire, M.E, Cowan, J.A (2002) Mg²⁺ chemistry and biochemistry. *Biometals* **15**, 203–210.
10. Kehres, D.G, Maguire, M.E (2002) Structure, properties and regulation of magnesium transport proteins. *Biometals* **15**, 261–270.
11. <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/361875/manganese-Mn>
12. Santos-Burgoa, Carlos, et al. "Exposure to manganese: health effects on the general population, a pilot study in central Mexico." *Environmental Research* **85.2** (2001): 90-104.
13. <http://www.clinical.bioiatriki.gr/analysis/pdfs/b15.pdf>
14. Kondakis, Xenophon G., et al. "Possible health effects of high manganese concentration in drinking water." *Archives of Environmental Health: An International Journal* **44.3** (1989): 175-178.
15. http://webmineral.com/chem/Chem-Mn.shtml#.UzvD2ah_tBY
16. http://en.wikibooks.org/wiki/Introduction_to_Inorganic_Chemistry/Red_ox_Stability_and_Redox_Reactions
17. <http://crustal.usgs.gov/laboratories/icpms/intro.html>

18. http://en.wikipedia.org/wiki/Inductively_coupled_plasma_mass_spectrometry
19. http://en.wikipedia.org/wiki/Inductively_coupled_plasma_atomic_emission_spectroscopy
20. Li, Xiangdong, et al. "Sequential extraction of soils for multielement analysis by ICP-AES." *Chemical Geology* 124.1 (1995): 109-123.
21. Zhao, F., S. P. McGrath, and A. R. Crosland. "Comparison of three wet digestion methods for the determination of plant sulphur by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES)." *Communications in Soil Science & Plant Analysis* 25.3-4 (1994): 407-418.
22. Sanchez, Luiza Fernandez, and Joanna Szpunar. "Speciation analysis for iodine in milk by size-exclusion chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection (SEC-ICP MS)." *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 14.11 (1999): 1697-1702.
23. Regnier, Fred E. "High-performance liquid chromatography of biopolymers." *Science* 222.4621 (1983): 245-252.
24. http://www2.pc.tu-clausthal.de/service/SEC_en.shtml
25. Hendrickson, H. Stewart, and Clinton E. Ballou. "Ion exchange chromatography of intact brain phosphoinositides on diethylaminoethyl cellulose by gradient salt elution in a mixed solvent system." *Journal of Biological Chemistry* 239.5 (1964): 1369-1373.
26. Dent, C. E., W. Stepka, and F. C. Steward. "Detection of the free amino acids of plant cells by partition chromatography." *Nature* 160.4072 (1947): 682-682.
27. http://en.wikipedia.org/wiki/Capillary_electrophoresis
28. M. Quintana, A. Klouda, A. Gondikas, M. Ochsenkuehn-Petropoulou, B. Michalke "Analysis of size characterized manganese species from liver extracts using capillary zone electrophoresis coupled to inductively plasma mass spectrometry(CZE-ICP-MS)." *Analytica Chimica Acta* 172-180(2006)

29. B. Michalke, Achim Berthele, P. Mistriotis, M. Ochenkuehn-Petropoulou, "Manganese speciation in human cerebrospinal fluid using CZE coupled to inductively coupled plasma MS", *Electrophoresis* 1380-1386(2007)
30. 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", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 1130-1137(2010)
31. R.M. Bowler, H.A. Roels, S. Nakagawa, M. Drezgic, E. Diamond, R. Park, W. Koller, R.P. Bowler, D. Mergler, M. Bouchard, D. Smith, R. Gwiazda, R.L. Doty, Dose-effect relationships between manganese exposure and neurological, neuropsychological and pulmonary function in confined space bridge welders, *Occupational and environmental medicine*, 64 (2007) 167-177.
32. B.A. Racette, M. Aschner, T.R. Guilarte, U. Dydak, S.R. Criswell, W. Zheng, Pathophysiology of manganese-associated neurotoxicity, *Neurotoxicology*, 33 (2012) 881-886.
33. W. Laohaudomchok, X. Lin, R.F. Herrick, S.C. Fang, J.M. Cavallari, R. Shrairman, A. Landau, D.C. Christiani, M.G. Weisskopf, Neuropsychological effects of low-level manganese exposure in welders, *Neurotoxicology*, 32 (2011) 171-179.
34. M.R. Flynn, P. Susi, Neurological risks associated with manganese exposure from welding operations--a literature review, *International journal of hygiene and environmental health*, 212 (2009) 459-469.
35. R.A. Yokel, Manganese flux across the blood-brain barrier, *Neuromolecular medicine*, 11 (2009) 297-310.
36. R.G. Lucchini, C.J. Martin, B.C. Doney, From manganism to manganese-induced parkinsonism: a conceptual model based on the evolution of exposure, *Neuromolecular medicine*, 11 (2009) 311-321.
37. M. Aschner, T.R. Guilarte, J.S. Schneider, W. Zheng, Manganese: recent advances in understanding its transport and neurotoxicity, *Toxicology and applied pharmacology*, 221 (2007) 131-147.
38. X. Liu, K.A. Sullivan, J.E. Madl, M. Legare, R.B. Tjalkens, Manganese-induced neurotoxicity: the role of astroglial-derived nitric oxide in striatal

- interneuron degeneration, *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 91 (2006) 521-531.
39. R.A. Yokel, J.S. Crossgrove, Manganese toxicokinetics at the blood-brain barrier, *Research report*, (2004) 7-58; discussion 59-73.
40. B. Michalke, Manganese speciation using capillary electrophoresis-ICP-mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 1050 (2004) 69-76.
41. M. Quintana, A.D. Klouda, A. Gondikas, M. Ochsenkuhn-Petropoulou, B. Michalke, Analysis of size characterized manganese species from liver extracts using capillary zone electrophoresis coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (CZE-ICP-MS), *Analytica chimica acta*, 573-574 (2006) 172-180.
42. B. Michalke, A. Berthele, P. Mistrionis, M. Ochsenkuhn-Petropoulou, S. Halbach, Manganese species from human serum, cerebrospinal fluid analyzed by size exclusion chromatography-, capillary electrophoresis coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements*, 21 Suppl 1 (2007) 4-9.
43. 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, *Analytica chimica acta*, 627 (2008) 258-269.
44. T.K. Dickinson, A.G. Devenyi, J.R. Connor, Distribution of injected iron 59 and manganese 54 in hypotransferrinemic mice, *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 128 (1996) 270-278.
45. P. Goldoni, L. Sinibaldi, P. Valenti, N. Orsi, Metal complexes of lactoferrin and their effect on the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*, *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 13 (2000) 15-22.
46. 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 (2013) 2301-2309.

47. 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 (2004) 451-460.
48. 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) 115-123.
49. M. Aschner, Manganese: brain transport and emerging research needs, *Environmental health perspectives*, 108 Suppl 3 (2000) 429-432.
50. W. Zheng, M. Aschner, J.F. Ghersi-Egea, Brain barrier systems: a new frontier in metal neurotoxicological research, *Toxicology and applied pharmacology*, 192 (2003) 1-11.
51. M.A. Atkinson, C.B. Pierce, J.J. Fadrowski, N.M. Benador, C.T. White, M.A. Turman, C.G. Pan, A.G. Abraham, B.A. Warady, S.L. Furth, Association between common iron store markers and hemoglobin in children with chronic kidney disease, *Pediatric nephrology*, 27 (2012) 2275-2283.
52. J.E. Siff, S.W. Meldon, A.J. Tomassoni, Usefulness of the total iron binding capacity in the evaluation and treatment of acute iron overdose, *Annals of emergency medicine*, 33 (1999) 73-76.
53. J.W. Critchfield, C.L. Keen, Manganese + 2 exhibits dynamic binding to multiple ligands in human plasma, *Metabolism: clinical and experimental*, 41 (1992) 1087-1092.
54. 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 Atom Spectrom*, 25 (2010) 1130-1137.
55. 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 (2009) 3-16.
56. D. Smith, R. Gwiazda, R. Bowler, H. Roels, R. Park, C. Taicher, R. Lucchini, Biomarkers of Mn exposure in humans, *American journal of industrial medicine*, 50 (2007) 801-811.

57. 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 (2012) 69-74.
58. M.G. Baker, C.D. Simpson, L. Sheppard, B. Stover, J. Morton, J. Cocker, N. Seixas, Variance components of short-term biomarkers of manganese exposure in an inception cohort of welding trainees, *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements*, (2014).
59. 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, *Environmental health perspectives*, 115 (2007) 122-127.
60. 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, *Environmental health perspectives*, 119 (2011) 138-143.
61. 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 (2006) 210-216.
62. R. Eastman, T. Jursa, C. Benedetti, R. Lucchini, D. Smith, Hair as a Biomarker of Environmental Manganese Exposure, *Environmental science & technology*, (2012)
63. Weiss, Economic implications of manganese neurotoxicity, *Neurotoxicology*, 27 (3) (2006), pp 362-368
64. 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
65. http://www.geo.auth.gr/courses/gmo/gmo645y/pdf_theory/mn.pdf
66. B. Michalke, S. Halbach, V. Nischwitz, Speciation and toxicological relevance of manganese in humans, *J Environ Monit*, 9(7) (2007), p.650

67. 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
68. Π. Μιστριώτης, Ειδοταυτοποίηση Μαγγανίου σε δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού με εφαρμογή της μεθόδου CZE-ICP-MS, Διπλωματική εργασία Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ, 2007
69. Α. Κλουδά, Ειδοταυτοποίηση Μαγγανίου σε δείγματα βοδινού συκωτιού με εφαρμογή της μεθόδου CZE-ICP-MS, Διπλωματική εργασία σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ, 2006

