

**A KÖRNYEZETI EREDETŰ ARZÉN ÉS MANGÁN FUNKCIONÁLIS  
NEUROTOXICITÁSA, ÉS NÉHÁNY TERMÉSZETES ANTIOXIDÁNS  
LEHETSÉGES VÉDŐ HATÁSA**

**PhD értekezés tézisei**

**Sárközi Kitti**

**Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar  
Népegészségtani Intézet  
Szeged, 2015**



**A KÖRNYEZETI EREDETŰ ARZÉN ÉS MANGÁN FUNKCIONÁLIS  
NEUROTOXICITÁSA, ÉS NÉHÁNY TERMÉSZETES ANTIOXIDÁNS  
LEHETSÉGES VÉDŐ HATÁSA**

**PhD értekezés tézisei**

**Sárközi Kitti**

**Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar  
Népegészségtani Intézet  
Szeged, 2015**



## BEVEZETÉS és CÉLKITŰZÉS

A környezeti vagy foglalkozási eredetű nehézfém-expozíciók jelentős mértékű oxidatív stresszt okoznak. Ilyenkor felborul az egyensúly a metabolikus reakciókban keletkező reaktív oxigén és nitrogén szabadgyökök (ROS és RNS), illetve az ezeket semlegesítő enzimatis és nem enzimatis folyamatok között. A mitokondriumokban zajló oxidatív energiatermelés során bizonyos elektronok túl korán kiléphetnek a transzportláncból, majd közvetlenül reagálnak az  $O_2$  molekulával, ami (az energiatermelés mellékreakciójaként) oxidatív stresszt okoz. Az elsődleges termék a szuperoxid anion ( $O_2^{\bullet-}$ ), mely hidroxil ( $^{\bullet}OH$ ) és a hidroperoxi ( $HOO^{\bullet}$ ) szabadgyökökké alakul tovább. Fontos szerepet játszanak a nitrogén szabadgyökök (RNS) is, legismertebb közülük a nitrogén-monoxid ( $NO^{\bullet}$ ), amely fontos szignálmolekula. Az oxidatív stressz mértékének növekedését okozhatja számos környezeti xenobiotikum, beleértve a fémeket. A nem semlegesített reaktív szabadgyökök károsítják az idegrendszert, a májat, a veséket stb. A szabadgyököket egyre inkább felelősnek tartják számos krónikus nem fertőző betegségért, valamint az öregedésért. A központi és perifériás idegrendszer, az intenzív mitokondriális energiatermelő folyamatnak, a nagymennyiségű telítetlen lipid jelenlétének, és az agy alacsony antioxidáns védő kapacitásának betudhatóan, igen érzékeny az oxidatív károsító hatásokra. A ROS lehet a „végső közös út” több neurotoxikum számára, mivel a membránlipidek oxidatív károsodása elváltoztathatja a neuronok működésében kulcsszerepet játszó membránszintű folyamatokat.

A környezetben előforduló, oxidatív stresszt okozó toxikus anyagok közt számos nehézfém is jelen van. A folyamatos nehézfém expozíció egyfajta “csendes járványnak” is tekinthető a modern társadalmakban, amely felelős lehet az IQ-szint csökkenésért, az antiszociális viselkedés növekvő kockázataért, az idegrendszeri fejlődési rendellenességekért, valamint az agyi funkciózavarokért. A legújabb megközelítés szerint az elemeket a periódusos rendszerben elfoglalt helyük alapján minősítik nehézfémnek. Biológiaiilag a legfontosabb tulajdonságaik az egynél több oxidációs állapot, valamint a koordinációs kötés létesítésére való képesség. Jelen értekezés témája két nehézfém, az arzén (As) és a mangán (Mn).

Az arzén (As) nagy mennyiségben megtalálható a földkéregben, így kis mennyiségben mindenhol jelen van. Emberi expozícióhoz ez pl. a színesfém-ércek bányászata és feldolgozása során vezet. Korábban az arzént számos módon felhasználták (festékek, fakonzerválók, peszticidek, sőt gyógyszerek), egészségkárosító hatásuk miatt azonban mára ezek használata többnyire megszűnt. A félvezetők gyártása során való felhasználás

veszélytelen. A legfontosabb humán expozíciós arzénforrás az ivóvíz. A felszín alatti vizek arzéntartalmát a földkéreg geokémiai tulajdonságai befolyásolják. Ázsiában és Dél-Amerikában komoly problémát okoz az ivóvizek magas arzéntartalma. Délkelet-Magyarországon és a kapcsolódó romániai és szerbiai régiókban a helyzet kevésbé súlyos, de az ivóvíz arzénszintje több településen még mindig meghaladja 10 µg/L határértéket. Lehetséges, hogy az arzén egy mikro-tápelem, de nagy mennyiségben mérgező, szerepel a 10 legveszélyesebb kémiai anyag WHO-listáján. Az arzén 4 oxidációs állapotban ill. szervetlen és szerves formában fordulhat elő. Az As<sup>III</sup> (+3 oxidációs számú) szervetlen arzénvegyületek a legmérgezőbbek, míg szerves vegyületei gyakorlatilag nem mérgezőek. Az arzén erősen kötődik a fehérjék –SH csoportjához, ezáltal inaktíválva számos enzimet és elősegítve a szabadgyökök keletkezését. A redukált glutation és a tioredoxinok elfogyasztásával elősegíti a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> keletkezését, ezáltal is növelve az oxidatív stressz mértékét. A krónikus szervetlen arzén-expozíció hatására növekedhet a szív-és érrendszeri megbetegedések, a máj, a vesék és az idegrendszer károsodásának mértéke. Egy házilag fűt kút ivóvizének magas arzéntartalma encefalopátiát, majd kómát eredményezett. Arzén-expozíciónak kitett iskolásoknál kimutatták, hogy a kognitív fejlődésük zavarai összefüggésben van a vizeletben mért arzénszinttel. Habár az arzén neurotoxicitásának elektrofiziológiai hatásairól kevés adat áll rendelkezésünkre, arzénal exponált rézkohász munkásoknál megváltozott EEG aktivitást, vizuális kiváltott potenciálokot és perifériás idegi aktivitást detektáltak. Ugyanazon személyekben az oxidatív stressz mértéke is megnőtt, és - az elektrofiziológiai változásokkal együtt - összefüggést mutatott a belső arzénszinttel.

A mangán (Mn) oxidációs állapota -3 és +7 között változhat - ez elősegíti a redox reakciókban való részvételét. Ennek, és a Mn komplexképző képességének, biológiai és toxikológiai jelentősége van. A mangánnak és vegyületeinek számos felhasználása ismert. A mangán egy esszenciális mikroelem a növények, az állatok és az emberek számára. Számos enzim, mint például a Mn-függő glutamin-szintetáz (mely az asztrocitákban a glutamát turnover-ért felelős) és a szuperoxid dizmutáz (mely a mitokondriumot védi az oxidatív stresszel szemben) kofaktora. Noha nélkülözhetetlen nyomelem, nagy mennyiségben neurotoxikus., A lakosság magas mangántartalmú ivóvízzel vagy élelmiszerrel exponálódhat, bár itt a tipikus neurotoxikus tünetek ritkák. A foglalkozási Mn-expozíció általában inhaláció során következik be, leggyakrabban a fémiparban hegesztés során, és gyakran neurológiai problémákhoz vezet. A mangán megzavarja a glutamaterg, kolinerg, dopaminerg és GABAerg neurotranszmissziót, a mitokondriumok károsodását okozza, valamint gátolja a feszültségfüggő Ca-csatornák működését az idegsejtekben. A Mn általános és

neurotoxicitásában szerepe van az oxidatív stressznek; a dopamin és más katekolaminok oxidációja és a mitokondiumok károsítása által. A helyi magas mangánszint miatt a Mn-SOD és a glutation-peroxidáz aktivitása csökken. A leggyakoribb mangán okozta neurológiai megbetegedés a manganizmus, amely hasonló tünetekkel jár, mint a Parkinson kór. Erős Mn-expozíciót elszenvedő emberekben megfigyelhető volt az EEG és vizuális kiváltott potenciálok változása, az epileptikus aktivitás és izomrángás. Munkahelyeken a Mn inhalációja a Mn-tartalmú aeroszol által történik, melyben úgynevezett nanopartikulumok (NP, méretük kisebb, mint 100 nm) is jelen vannak. A nanopartikulumok jelentős szerepet játszanak számos krónikus nem fertőző betegség kialakulásában. Az inhalált NPk megtapadnak az orrgaratban, vagy lejutnak az alveolusokba. Kicsiny méretük miatt mobilisak és könnyen átjutnak a határfelületeken. A nagy és igen reaktív felületük miatt fontos szerepet játszanak a reaktív szabadgyökök képződésében. A Mn expozíció és neurológiai-neuropszichiátriai kórképek közötti összefüggések megfigyelhetőek mind a magas munkahelyi mangán expozíciónak kitett, mind az alacsony szintű, de krónikus mangán expozíciónak kitett emberek esetében. Exponált iskolás gyerekeknél megfigyeltek motoros és a szaglási funkciózavart, abnormális viselkedést és az IQ csökkenését.

Az élőlények számos biokémiai mechanizmus segítségével képesek magukat megvédeni az endogén, valamint a xenobiotikumok által indukált oxidatív stresszel szemben. Az itt szerepet játszó kis biomolekulák az antioxidánsok (szigorúan véve csak az exogén, azaz élelmiszer eredetűek, mint a C vitamin, E vitamin és a flavonoidok). Az akutális redox állapottól függően ugyanazon molekula képes redukáló, azaz antioxidáns, vagy oxidáló, azaz prooxidáns módon funkcionálni. A két legfontosabb endogén antioxidáns molekula a glutation és a húgysav, de szintén antioxidáns tulajdonságokkal rendelkezik a liponsav és a melatonin is. Az exogén antioxidánsok mikrotápanyagok, melyeknek a táplálékban elegendő mennyiségben jelen kell lenniük. Egy részük esszenciális faktor, ismert napi szükséglettel és hiánybetegségekkel. A munkánk során alkalmazott antioxidánsok ebbe a kategóriába tartoznak. A C-vitamin, más néven aszkorbinsav, esszenciális az emberek és a főemlősök számára, míg az egyéb fajok képesek szintetizálni. Az aszkorbinsav megköti a szabadgyököket, javítva ezzel a mitokondrium működését és védve a membránlipideket, valamint visszaalakítja az oxidált glutationt. A bélből való felszívódása korlátozott és függ az aktuális szükséglettől; az agyi felvétel szintén aktív folyamat. A kémiai környezettől függően a C vitamin prooxidánsként is funkcionálhat. A C vitamin egy jól ismert és leírt természetes anyag, az egyik legfontosabb antioxidánsként tartják számon, amely sokféle ételben és italban előfordul. A rutin (kvercetin-3-rutinozid) egy flavonoid, megtalálható

többek között a citrusfélékben és a rebarbarában. Hatását tekintve gyökfogó, de az oxidatív hatásra hajlamos fémeket is kelátkötésbe fogja. A rutinnak számos egészségre gyakorolt pozitív hatása van: véd az oxidatív stressz, az allergia, a daganatok kialakulása valamint a vírusfertőzések ellen, továbbá gyulladáscsökkentő és vérnyomáscsökkentő hatású is, viszont nehezen szívódik fel a béltraktusból. A rutin neuroprotektív hatását már bizonyították Alzheimer-kór és agyi ischemia állatmodelljeiben. A zöld tea flavonoidjai - főként a katekinek - a teacerje leveleinek 35-40%-át alkotják. A zöld tea főzetet a leartott, de nem fermentált levelek forrázásával készíthetjük el. A világszerte népszerű tea a legfőbb flavonoid forrásunk. A katekinek neuroprotektív hatása az antioxidáns, valamint a fémkelátor hatáson alapszik, de képesek aktiválni transzkripciós faktorokat és antioxidáns enzimeket is. A neurodegeneratív megbetegedések gyakorisága és a tea fogyasztás népszerűsége alapján a tea protektív hatását széleskörűen vizsgálják. A kurkumin a kurkuma növény gyökeréből izolált sárga színű anyag, amelynek számos egészségre gyakorolt pozitív hatása van: véd az oxidatív stressz, a daganatok kialakulása valamint az ischemia ellen, továbbá gyulladáscsökkentő és vérnyomáscsökkentő hatása is van. Állatmodellekben hatásosnak bizonyult az Alzheimer kór, valamint a vegyi anyagok okozta neurotoxikus hatások ellen. A kurkumint erős szabadgyök- valamint fémmegkötő hatású. Lipofil tulajdonságainak köszönhetően könnyedén átjut a vér- agy gáton. Az utóbbi 10 évben megnövekedett az érdeklődés az élelmiszer-eredetű antioxidánsok iránt. Epidemiológiai tanulmányok szerint a növényi polifenokokban gazdag étrend hosszú távon védelmet nyújthat többek között a krónikus neurodegeneratív megbetegedések ellen. Felvetették az antioxidánsban dús „funkcionális italok” létrehozásának lehetőségét is. A sejtkultúrák, továbbá a kísérleti állatok esetében tapasztalt előnyös hatásokat azonban emberek esetében eddig csak igen korlátozott mértékben igazolták.

A fémekkel (félfémekkel) történő expozíció továbbra is egészségkárosító hatással van a népességre. Az oxidatív stressz jelentős szerepet játszik a fémek károsító mechanizmusában, különösen az oxidatív támadások ellen csekély védelemmel rendelkező idegrendszer esetén. Külsőleg bevitt antioxidánsok alkalmazásával viszont megerősíthető az oxidatív hatások elleni védekezés, csökkenthető az idegrendszer károsodásának mértéke. Jelen munka általános célja a szubakut kísérleti elrendezésben adagolt arzén és mangán által kiváltott idegrendszeri funkcionális károsodások kivédése volt, természetes eredetű antioxidáns vegyületek alkalmazásával

Az alábbi kérdéseket szeretnénk megválaszolni a kapott eredmények alapján:

- Lehetséges az arzén és a mangán itt használt fizikokémiai formáinak toxikus hatását vizsgálni azonos kísérleti elrendezésben?



- Képesek az antioxidáns vegyületek befolyásolni a két alkalmazott fém hatásait?
- Milyen mennyiségi vagy minőségi különbségek vannak az antioxidánsok hatásai között?
- Mely típusú antioxidánsokat célszerű választani, ha az emberi egészség védelmének szempontját is figyelembe kívánjuk venni?

## ANYAGOK és MÓDSZEREK

Munkánk során 3 kísérletet végeztünk fiatal hím Wistar patkányokkal, amelyeket arzénnal és mangánnal, valamint természetes antioxidánsokkal - aszkorbinsavval, rutinnal, kurkuminnal és zöld teával – kezeltünk; a kísérleti elrendezést az alábbi táblázatban láthatjuk. Az alkalmazott anyagokat és kezelési módokat a tényleges humán expozícióhoz hasonlóan igyekeztünk megválasztani.

	1. kísérlet	2. kísérlet	3. kísérlet
Időtartam, anyagok, adagolási mód	4 hetes intratracheális MnO <sub>2</sub> NPs kezelés (4 mg/ttkg) majd 1 hét antioxidáns adagolás (aszorbinsav, kurkumin, rutin és azok vivőanyagai) 100 mg/ttkg, gyomorszondával	6 hetes kezelés gyomorszondával As 5 és 10 mg/ttkg (NaAsO <sub>2</sub> ,) és aszkorbinsav 1 g/l, zöldtea-főzet, 2.5 g/500 ml, ivóvízként adva	6 hetes kezelés gyomorszondával As 10 mg/ttkg (NaAsO <sub>2</sub> ,) vagy intratracheális MnO <sub>2</sub> NPs kezelés 4 mg/ttkg és aszkorbinsav, 2 g/l, rutin, 1 g/l, zöldtea-főzet, 2.5 g/500 ml, ivóvízként adva
Vizsgálatok	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Testtömeg</li> <li>• Szervtömegek</li> <li>• Open field teszt</li> <li>• Elektrofiziológia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Testtömeg</li> <li>• Táp- és folyadék-fogyasztás</li> <li>• Szervtömegek</li> <li>• Open field teszt</li> <li>• Elektrofiziológia</li> <li>• Biokémiai mérések</li> <li>• Szöveti fémszint mérés</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Testtömeg</li> <li>• Táp- és folyadék fogyasztás</li> <li>• Szervtömegek</li> <li>• Open field teszt</li> <li>• Elektrofiziológia</li> <li>• Biokémiai mérések</li> <li>• Szöveti fémszint mérés</li> </ul>

Három vagy négy állatot helyeztünk el egy ketrecben, GLP-szintű feltételek mellett (22±1°C, 40-60% relatív páratartalom, 12 órás világos/sötét periódus), az állatok szabadon fogyaszthatták a rágcsálótápot és a folyadékot (csapvizet, vagy a kezelés során alkalmazott oldatokat).

Az 1. kísérlethez a  $\text{MnO}_2$  nanopartikulumokat a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék munkatársai biztosították. A szintézis nedves reakció során, lúgos – poliakrilamidot és redukáló ágensként etanolt tartalmazó - közegben történt. A  $\text{KMnO}_4$  oldatot a közegbe csepegtették, ekkor 25-30 nm átmérőjű  $\text{MnO}_2$  nanopartikulumok keletkeztek. A 3. kísérlethez a  $\text{MnO}_2$  NP-t a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar, Alkalmazott és Környezeti Kémiai Tanszékén szintetizálták. A vizes  $\text{KMnO}_4$  oldatot etilén-glikollal keverték össze, majd egy ultrahang készülékben kezelték. A kapott szuszpenziót  $200^\circ\text{C}$ -on hevítették 16 órán át, majd hagyták szobahőmérsékletre hűlni. A csapadékot leszűrték, mosták, majd  $100^\circ\text{C}$ -on szárították 1 órán keresztül. A kémiai tisztaságot és a részecskeméretet (25-30 nm) elektronmikroszkóppal, valamint röntgen-diffrakciós eljárással ellenőrizték. Kezelés előtt a  $\text{MnO}_2$  NP-t 1%-os hirdoxietil-cellulózt tartalmazó puffereelt fiziológiás közegben (PBS;  $\text{pH}=7.4$ ) szuszpendáltuk, és intratracheálisan (it.) adagoltuk az állatoknak.

A kristályos  $\text{NaAsO}_2$ -et desztillált vízben oldottuk, majd gyomorszondán keresztül kezeltük a patkányokat.

Az antioxidáns tartalmú oldatokat különbözőképpen készítettük el. Az 1. kísérlet során az antioxidánsokat gyomorszondával adtuk be naponta egyszer, egy héten keresztül; az aszkorbinsavat vízben, míg a rutint és a kurkumint napraforgó olajban oldva. A 2. és 3. kísérletben az antioxidánsokat ivóvízben adagoltuk 6 héten keresztül. A C vitamint - az oldott oxigén és klór eltávolításának céljából - kiforralt, majd szobahőmérsékletre lehűtött csapvízben oldottuk fel. A pH értéket  $\text{NaHCO}_3$  hozzáadásával 7.5-re állítottuk, hogy megakadályozzuk az aszkorbinsav bomlását. A harmadik kísérletben a por állagú rutint 1 g/l koncentrációban az előre elkészített csapvízhez adagoltuk lassú keverés mellett, majd  $\text{NaHCO}_3$  hozzáadásával a pH értéket 9,8-ra állítottuk, ahol a rutin teljesen feloldódott. Végül 20 %-os ecetsavval a pH értéket 7,8-ra csökkentettük. A második és a harmadik kísérletben a zöld tea főzetet 2.5 g tealevél 500 ml felforralt csapvízzel történő forrázásával készítettük.

Általános toxikológiai és kémiai-biokémiai mérések: a patkányok testtömegét mindhárom kísérletben naponta mértük, ekkor általános egészségi állapotukat is megfigyeltük. A 2. és 3. kísérlet során a táp- és folyadékfogyasztást szintén mértük, utóbbi segítségével kalkuláltuk a bevitt antioxidánsok mennyiségét. Miután a magatartás- és elektrofiziológiai vizsgálatok befejeződtek, az állatokat uretánnal túlaltattuk, majd felboncoltuk. Az állatokat transzkardiálisan perfundáltuk 500 ml PBS oldattal annak érdekében, hogy a szervekből kimosódjon a vér. A szerveket eltávolításuk után lemértük, majd kiszámoltuk a relatív

szervtömegeket. Fémszint meghatározás, valamint biokémiai mérések céljából minden csoportból véletlenszerűen kiválasztottunk 3 állatot. Az agyat, májat, veséket, valamint állatonként 2-3 ml vörösvértestet folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Az arzén- ill. mangánszinteket, a minták salétomsavas emésztése után, plazma tömegspektrometriás módszerrel (ICP-MS) mértük. Az oxidatív stressz indikátorokat ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$ , TBARS) az agykéregből, valamint a vörösvértestekből mutattuk ki a második és a harmadik kísérletben - ugyanazokból a mintákból, amelyekből a fémszinteket is meghatároztuk.

Magatartásvizsgálatok: a patkányok spontán mozgási aktivitását open field (OF) módszerrel vizsgáltuk (Conducta 1.3). Az OF tesztet általában az utolsó kezelés utáni napon végeztük (az 1. kísérletben egy héttel a kezelési periódus befejezése előtt is).

Az OF boxban a padló szintjén, valamint 12 cm magasságban, infravörös érzékelők sora van. A fénysugarak megszakításaiból kiszámítható az aktivitás alapformáinak (helyzetváltoztatás, helyváltoztatás, ágaskodás, mozdulatlanság) eseményszáma és összesített ideje, valamint a megtett távolság.

Elektrofiziológiai vizsgálatok: az utolsó OF teszt utáni napon az állatokat elaltattuk 1000 mg/ttkg ip. uretánnal. A lágy szövetek és a falcsont eltávolításával feltártuk a bal agyféltekét. Ezt legalább 30 perces nyugalom követte, majd az állatot a regisztráló berendezés sztereotaxiás készülékébe helyeztük. Az elsődleges szomatoszenzoros (SS, a bajuszpárna vetülete), vizuális (VIS) és akusztikus (AUD) mező fölött a dura felszínére gömbvégű ezüst elektródákat illesztettünk. Az SS ingerlés az ellenoldali bajuszpárnába adott elektromos négyszögjelekkel történt, VIS ingerként az ellenoldali szembe adott villanások, míg AUD ingerként „click”-ek szolgáltak. A farokidegből összetett akciós potenciált (CAP) vettünk fel. A regisztrálás elején 6 percig a kérgi mezők spontán aktivitását (elektrokortikogram, EKoG) vettük fel, ebből a frekvenciasávok szerinti relatív teljesítmény-spektrumot kaptuk meg. Ezután ugyanonnan, ugyanazon elektródákkal a kérgi kiváltott potenciálokat (KP) regisztráltuk, végül pedig a farok CAP-t. A kiváltott jeleken, átlagolás után, manuálisan határoztuk meg a latenciát és időtartamot. Az adatok regisztrálása és értékelése a NEUROSYS 1.11. szoftverrel történt.

Statisztikai értékelés: az adatok eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszttel vizsgáltuk. Az analízist parametrikus egyutas ANOVA módszerrel vizsgáltuk SPSS 17.0. szoftver segítségével. A post hoc analízist a csoportok közti különbségek vizsgálata céljából a Scheffe's teszttel végeztük,  $p < 0.05$  szignifikancia szint mellett. A lineáris korrelációt a

fém szintek és a neurotoxikológiai paraméterek között a „lineáris illeszkedés” funkcióval végeztük MS Excel programmal.

A kísérleti eljárást az egyetem Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanácsa jóváhagyta. (engedélyszámok: No. XXI./02039/001/2006 és XXI./151/2013).

## **EREDMÉNYEK és KONKLÚZIÓ**

Az As és Mn is csökkentette a testtömeg-gyarapodást. A tápfogyasztás csökkenése ezzel az As-kezelés esetében (2. és 3. kísérlet) részleges, míg Mn-kezelésnél (3. kísérlet) szinte teljes párhuzamot mutatott. Az alkalmazott antioxidánsok a fémek testtömegre tett hatását gyengén vagy egyáltalán nem ellensúlyozták, viszonylag egyértelmű hatása csak a rutinnak volt. A MnO<sub>2</sub> NP-vel instillált patkányok tüdejének tömege (1. és 3. kísérlet) nagymértékben megnőtt, és erre az antioxidánsoknak nem volt hatása. Ezen felül csak a mellékvesék reagáltak az As- és Mn-expozícióra, nem igazán egyértelmű é az antioxidánsok által kevésbé befolyásolt súlynövekedéssel.

Az arzénszint emelkedett a kezelt patkányok vvt-iben, agykérgében, májában és veséjében (legerősebben az utóbbiban), ezt az antioxidánsok csak mérsékelten csökkentették. A 3. kísérletben a Mn szöveti felhalmozódását is kimutattuk, erre nem hatottak az antioxidánsok.

Az OF-tesztben az antioxidánsok önmagukban nem hatottak az nálatok mozgásaira. Az As a motilitást a 2. kísérletben kevésbé, a 3. kísérletben kifejezettebben csökkentette: a helyzetváltoztatások és a mozdulatlanság fokozódott, míg az ágaskodások száma és ideje csökkent. A Mn motilitásra tett hatása (1. és 3. kísérlet) hasonló volt. A zöld tea alig hatott az As ill. Mn által elváltoztatott OF magatartásra. A rutin a 3. kísérletben az As magatartási hatását inkább, a Mn-ét kevésbé ellensúlyozta, az aszkorbinsav pedig csak a Mn hatását befolyásolta. A rutin az 1. kísérletben csökkentette a patkányok Mn által erősített vonzódását az OF doboz sarki zónáihoz is.

Elektrofiziológiai hatások: Az EKoG sáv spektrumára csak a nano-Mn volt hatással, az As nem. A magasabb frekvencia felé való eltolódás az 1. kísérletben kevésbé, a 3.-ban inkább kifejeződött. Az alacsony frekvenciák csökkenő aktivitását a zöld tea védte ki a legerősebben, a rutin kevésbé, az aszkorbinsav pedig egyáltalán nem.

A kiváltott aktivitásokban markánsabb változások léptek fel. Önmagukban az antioxidánsok jelentéktelen változást okoztak a KP-ok latenciájában. A nano-Mn-nal való kezelés

mindhárom modalításban a latencia szignifikáns növekedését okozta, amelyet a rutin és a zöld tea határozottan, az aszkorbinsav kevésbé, míg a kurkumin egyáltalán nem csökkentett. Arzén esetében hasonló volt a hatás, és az antioxidánsok ellenhatása is. A vezetési sebesség csökkenése a farokidegben As és Mn hatására is fellépett. Ezt legerősebben a rutin, kevésbé a zöld tea, és legkevésbé az aszkorbinsav ellensúlyozta. Az 1. kísérletben a kurkuminnak is volt enyhe védő hatása a vezetési sebesség nano-Mn okozta csökkenésével szemben.

Biokémiai hatások: A TBARS reakció intenzitása és a ONOO<sup>-</sup> szintje az As- és Mn-kezelés, illetőleg az antioxidánsok hatására olyan irányban változott, ami hatásnak és ellenhatásnak felel meg. Az As hatását legeggyértelműbben a rutin, a Mn-ét pedig az aszkorbinsav fordította meg. A belső fémdózisok (szöveti As- és Mn-szintek) és a megfigyelt neuro-funkcionális, valamint biokémiai változások közötti oksági viszonyt korrelációs próbával elemeztük. A 2. kísérletben a kérgi és perifériás elektrofiziológiai változások, és a kérgi TBARS reakció, szignifikáns lineáris korrelációt mutatott a kérgi As-szinttel. A 3. kísérletben a testtömeggyarapodás a májbeli As- ill. Mn-szinttel korrelált, míg egyes elektrofiziológiai és magatartási paraméterek, valamint a TBARS szint, a kérgi fémszintekkel, és egymással is. Az arzén, mangán és az antioxidánsok hatásait összesítve a következő oldalon látható táblázat mutatja.

(Jelmagyarázat: egyes nyíl: növekedés/csökkenés; kettős nyíl: szignifikáns növekedés/csökkenés; ⊕, ∅: hatás ill. ellenhatás van/nincs; Rut: rutin; VitC: aszkorbinsav; Kur: kurkumin; Tea: zöldtea-főzet.)

A kezelt patkányok idegrendszerében észlelt funkcióváltozásokban megnyilvánult néhány közös trend, mint pl. a csökkent OF motilitás vagy az elektrofiziológiai reakciók lassulása, ami felvetette a háttérben működő közös mechanizmus lehetőségét. Ilyen mechanizmus lehet az oxidatív stressz is, mivel szervesetlen reakciópartnerként mind az As, mind a Mn képes az élő közegben reaktív oxigén-származékokat kelteni, és ilyen hatást exponált emberekből is leírtak. Ugyancsak dokumentálva van mindkét fém esetében a központi idegrendszeri működések oxidatív stressz általi károsodása.

		As	Antioxidánsok ellenhatása	nano-Mn	Antioxidánsok ellenhatása
1. kísérlet	Testtömeg-gyarapodás			↓	⊕ gyenge Rut>VitC ∅ Kur
	Szervtömegek			tüdő ↑ mellékvese ↑	∅
	OF motilitás			Helyzetvált. ↑ Immob. ↑ Ágaskodás ↓	⊕ Rut ∅ VitC, Kur
	EKoG			Frekvencia magasabb ↑	∅
	KP-ok			Latencia ↑	⊕ Rut>VitC ∅ Kur
	Farokideg CAP			Vez. seb. ↓ Rel. refr. ↑	⊕ Rut>Kur ∅ VitC
	Korrelációk			SS KP lat., OF ágaskodás és Testtömeg-gyarapodás	
2. kísérlet	Testtömeg-gyarapodás	↓	∅		
	Szervtömegek	∅			
	OF motilitás	Helyzetv., immob. ↑	⊕ részleges: VitC, Tea		
	EKoG	∅	---		
	KP-ok	Latencia ↑	⊕ Tea>VitC		
	Farokideg CAP	Vez.seb. ↓	⊕ Tea>VitC		
	Fém szint	Kéreg ↑ Máj ↑, Vese ↑	∅		
	Oxidatív stressz: TBARS	Vvt ↑ Kéreg ↑	⊕ Tea ∅ VitC		
	Korrelációk	SS KP lat, Vez. seb., kérgi TBARS és Kérgi As-szint			
3. kísérlet	Testtömeg-gyarapodás	↓	⊕ Rut>Tea>VitC	↓	∅
	Szervtömegek	Mellékvese ↑	⊕ Rut	Mellékvese ↑ Máj ↓	⊕ Rut, gyengén
	OF motilitás	Helyzetv., immob. ↑ Ágaskodás ↓	⊕ Rut ∅ Tea, VitC	Helyzetv., immob. ↑ Helyvált. ↓	⊕ VitC>Rut
	EKoG	∅	---	Frekvencia magasabb ↑	⊕ Tea>Rut ∅ VitC
	KP-ok	Latencia ↑	⊕ Rut~Tea>VitC	Latencia ↑	⊕ Rut~Tea>VitC
	Farokideg CAP	Vez. seb. ↓	⊕ Rut>Tea>VitC	Vez seb. ↓	⊕ Rut~Tea>VitC
	Fém szint	Kéreg ↑ Máj ↑ Vese ↑	⊕ Rut>Tea~VitC ⊕ Rut>Tea>VitC ∅	Kéreg ↑ Máj ↑	∅
	Oxidatív stressz: TBARS	Vvt ↑ Kéreg ↑	⊕ Rut, Tea ⊕ Rut, Tea	Vvt ↑ Kéreg ↑	∅ ⊕ Tea, VitC
	Korrelációk	Testtömeg és máj As; OF helyzetv., SS KP lat., kérgi TBARS és kérgi As; OF helyzetv. és kérgi TBARS		Testtömeg és máj Mn; OF helyvált., SS EK lat., kérgi TBARS és kérgi Mn; OF helyvált. és kérgi TBARS	

A PhD munka során vizsgálta antioxidánsok mind kiejtettek ellenhatást az As ill. nano-Mn által okozott elektrofiziológiai és/vagy magatartási változásokra, azonban nem egyenlő mértékben. Az aszkorbinsav hatása a legtöbb esetben gyengébb volt a rutin vagy a zöld tea hatásánál, noha a mért antioxidáns kapacitása az utóbbiaknak volt alacsonyabb. A rutinnak és a zöld tea flavonoidjainak az oxidálódott biomolekulák közvetlen redukciójától független védő hatása mindenekelőtt fémionok megkötésében jelentkezik.

Mind a négy vizsgált antioxidáns természetes, élelmiszer-eredetű hatóanyag, és elvileg széles körbe hozzáférhető az arzénnal, mangánnal, vagy egyéb környezeti eredetű károsítóval érintkező populációk számára. Az így elérhető védőhatás valóságban érvényesülő hatásossága azonban még nincs bizonyítva, a neurodegeneratív betegségek elleni „funkcionális italok” megvalósítása még hátravan.

A célkitűzésben megfogalmazott kérdésekre végezetül az alábbi válasz adható:

- A 3. kísérletben az As és Mn adott fizikokémiai formájának általános és idegrendszeri toxicitását együtt, ugyanabban a kísérletben vizsgáltuk. Külön-külön a két fémrel azonos kísérlet nem történt, az első kérdésre mégis lényegében pozitív a válasz.
- A kísérletekben alkalmazott antioxidánsoknak volt több világosan kimutatható hatása a két fém által előidézett változásokra, az általános és idegrendszeri (magatartási és elektrofiziológiai) toxikus hatások terén is, azonban
- Az egyes antioxidánsok hatásai között kifejezett különbségek voltak, azaz: 1/ A kurkumin gyakorlatilag hatástalan volt. 2/ A C-vitamin védő hatása gyengébb volt, mint az alkalmazott flavonoidoké (rutin ill. a zöld tea alkotórészei). A különbség minden bizonnyal nem az antioxidáns kapacitásból, hanem inkább a fémkelátor-képességből, illetőleg jobb agyi hozzáférhetőségből eredhetett.
- Mindegyik vizsgált antioxidáns könnyen elérhető, természetes anyag. Definiált vegyületeként a rutin hatásosabbnak mutatkozott az aszkorbinsavnál. A zöld tea főzete (esetleg kivonata vagy koncentrátuma) kémiaiilag összetett, de fő komponensei ismert vegyületek. Az „optimális” antioxidáns kiválasztásakor, az igazolt in vivo védőhatáson túl, figyelembe kell venni technikai (források, feldolgozás, formálás) és társadalmi (elfogadottság a védendő populációban) szempontokat is; mindez pedig további kutatásokat igényel a környezeti neurotoxikológia keretein belül és azon kívül is.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Dr. Paulik Editnek, a Népegészségtani Intézet vezetőjének, és Prof. Dr. Nagymajtényi Lászlónak, az Interdiszciplináris Doktori Iskola Preventív Medicina programja vezetőjének, hogy PhD munkámhoz biztosították a szükséges feltételeket és segítettek a felmerülő problémák megoldásában.

Témavezetőm kezdetben Dr. Vezér Tünde, később Dr. Papp András és Dr. Szabó Andrea volt. Különösen az utóbbiaknak mondok köszönetet munkám minden módon való elősegítéséért.

Az állatkísérletes munkacsoport tagjainak – Dr. Horváth Edina, Dr. Lukács Anita, Dr. Máté Zsuzsanna – köszönöm a kísérletek végrehajtásához és kiértékeléséhez adott értékes hozzájárulásukat és támogatásukat.

A nano-mangán biztosítását köszönöm Prof. Dr. Tombácz Etelkának és Dr. Kovács Krisztinának (TTIK Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék) valamint Prof. Dr. Kónya Zoltánnak, Kozma Gábornak és Simon Tímeának (TTIK Alkalmazott és Környezeti Kémiai Tanszék).

Megköszönöm továbbá a Népegészségtani Intézet technikai munkatáraitól kapott segítséget.



**Megjelent közlemények:**

**Sárközi K**, Nagy V, Papp A, Tombácz E, Szabó A (2013): Effects of three natural antioxidants on the general and nervous system toxicity of manganese nanoparticles in rats. *Centr Eur J Occup Environ Med* 19, 31-42.

**Sárközi K**, Krisch J, Papp A (2013): Effect of green tea on arsenic toxicity in rats. In: Galbács Z (szerk.) *Proceedings of the 19th International Symposium on Analytical and Environmental Problems* (ISBN:978-963-315-141-9) pp. 261-264.

**Sárközi K**, Horváth E, Krisch J, Papp A (2013) General and nervous system effects of oral arsenic treatment in rats and possible ameliorating effects on antioxidants. In: Belojevic G (szerk.) *The First International Congress on Hygiene and Preventive Medicine. Proceedings* (ISBN:987-86-6061-034-0) pp. 494-500.

**Sárközi K**, Szabó A, Papp A (2013) Két természetes antioxidáns hatása patkányban kísérletileg előidézett arzénmérgezésre. In: Horváth J (szerk.) *Tudomány a vidék mindennapjaiban: Magyar Tudomány Ünnepe 2013.* (ISBN:978 963 306 245 6) pp. 72-77.

**Sárközi K**, Papp A, Horváth E, Máté Zs, Ferencz Á, Hermes E, Krisch J, Paulik E, Szabó A (2014): Green tea and vitamin C ameliorate some neuro-functional and biochemical signs of arsenic toxicity in rats. *Nutr Neurosci* <http://dx.doi.org/10.1179/1476830514Y.0000000151>. *IF: 2.114*

**Sárközi K**, Horváth E, Vezér T, Papp A, Paulik E (2014): Behavioral and general effects of subacute oral arsenic exposure in rats with and without fluoride. *Int J Environ Health Res* <http://dx.doi.org/10.1080/09603123.2014.958138> *IF: 1.513*

**Sárközi K**, Papp A, Máté Zs, Horváth E, Paulik E, Szabó A (2015): Rutin, a flavonoid phytochemical, ameliorates certain behavioral and electrophysiological alterations and general toxicity of oral arsenic in rats. *Acta Biol Hung* 66, 14-26. *IF: 0.563*

**Absztraktok:**

**Sárközi K**, Máté Zs, Vezér T, Papp A (2013): Behavioral changes and general toxicity in rats after subchronic inorganic arsenic and fluoride treatment. In: Csillag A (szerk.) *XIV. Conference of the Hungarian Neuroscience Society. Abstract Book* (ISBN 978-963-88224-2-0), Paper P 7.18.

**Sárközi K**, Papp A, Máté Zs, Horváth E, Szabó A (2014): Green tea counteracts certain nervous system and general toxic effects of arsenic and manganese in rats. In: Cotoraci C, Ardelean A (szerk.) *16th Danube-Kris-Mures-Tisa (DKMT) Euroregion Conference on Environment and Health: Book of Abstracts* (ISBN:978-973-664-707-9) p. 19.

**Sárközi K**, Papp A, Máté Zs, Horváth E, Szabó A (2014) A zöld tea ellensúlyozza az arzén és mangán egyes általános és neurotoxikus hatásait patkányban. *Fiatal Higiénikusok Fóruma X. Konferencia. Egészségtudomány LVIII.*, 106-107.

## Társszerzői nyilatkozat

Alulírott témavezetők ezúton kijelentjük, hogy az alábbi publikációkhoz:

*Sárközi K, Nagy V, Papp A, Tombácz E, Szabó A (2013): Effects of three natural antioxidants on the general and nervous system toxicity of manganese nanoparticles in rats. **Centr Eur J Occup Environ Med** 19, 31-42.*

*Sárközi K, Krisch J, Papp A (2013): Effect of green tea on arsenic toxicity in rats. In: Galbács Z (szerk.) **Proceedings of the 19th International Symposium on Analytical and Environmental Problems** (ISBN:978-963-315-141-9) pp. 261-264.*

*Sárközi K, Horváth E, Krisch J, Papp A (2013) General and nervous system effects of oral arsenic treatment in rats and possible ameliorating effects on antioxidants. In: Belojevic G (szerk.) **The First International Congress on Hygiene and Preventive Medicine. Proceedings** (ISBN:987-86-6061-034-0) pp. 494-500.*

*Sárközi K, Szabó A, Papp A (2013) Két természetes antioxidáns hatása patkányban kísérletileg előidézett arzénmérgezésre. In: Horváth J (szerk.) **Tudomány a vidék mindennapjaiban: Magyar Tudomány Ünnepe 2013.** (ISBN:978 963 306 245 6) pp. 72-77.*

*Sárközi K, Papp A, Horváth E, Máté Zs, Ferencz Á, Hermes E, Krisch J, Paulik E, Szabó A (2014): Green tea and vitamin C ameliorate some neuro-functional and biochemical signs of arsenic toxicity in rats. **Nutr Neurosci** <http://dx.doi.org/10.1179/1476830514Y.0000000151>. *IF: 2.114**

*Sárközi K, Horváth E, Vezér T, Papp A, Paulik E (2014): Behavioral and general effects of subacute oral arsenic exposure in rats with and without fluoride. **Int J Environ Health Res** <http://dx.doi.org/10.1080/09603123.2014.958138> *IF: 1.513**

*Sárközi K, Papp A, Máté Zs, Horváth E, Paulik E, Szabó A (2015): Rutin, a flavonoid phytochemical, ameliorates certain behavioral and electrophysiological alterations and general toxicity of oral arsenic in rats. **Acta Biol Hung** 66, 14-26. *IF: 0.563**

Sárközi Kitti doktorjelölt egyéni teljesítményével jelentős mértékben járult hozzá.

Kijelentjük továbbá, hogy a felsorolt közleményeket más PhD eljárásban nem használtuk és a jövőben sem használjuk fel.

Szeged, 2015. március 31.

Szabó Andrea PhD  
egyetemi adjunktus

Papp András PhD  
egyetemi docens



