



Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Perspectives in Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/permed



EINGELADENER ÜBERSICHTSARTIKEL

Neue Einsichten in die Toxizität und die Speziation von Mangan[☆]



Bernhard Michalke^{*}, Katharina Fernsebner

Abteilung Analytische Biogeochemie, Helmholtz-Zentrum München – Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH), Ingolstädter Landstr. 1, D-85764 Neuherberg, Deutschland

Eingegangen am 8. Juli 2013; angenommen am 30. August 2013

SCHLÜSSELWÖRTER

Mn-Exposition;
Manganismus;
Mn-Speziation;
molekulare
Interaktionen von Mn;
Mn-Biomonitoring

Zusammenfassung Mangan (Mn) ist seit mittlerweile 175 Jahren als neurotoxische Substanz bekannt. Daher ist es im Lauf des letzten Jahrhunderts intensiv erforscht worden. Von vorläufigen Beschreibungen ausschließlich über Symptomen bei Mn-exponierten bzw. überexponierten Arbeitern sind die Forschungsarbeiten zu detaillierteren Untersuchungen der toxischen Mechanismen von Mn fortgeschritten. Zur Aufklärung dieser neurotoxischen Mechanismen wurde eine Reihe von Studien durchgeführt, die z. T. in Übersichtsartikeln zusammengefasst wurden (z. B. Yokel RA. *Neuromol Med* 2009;11(4):297–310; Aschner M et al. *Toxicology Appl Pharmacol* 2007;221(2):131–47; Michalke B et al. *J Environ Monit* 2007;9(7):650). Seit unserem letzten Übersichtsartikel zur Mn-Speziation aus dem Jahr 2007 (Michalke B et al. *J Environ Monit* 2007;9(7):650) ist die Mn-Forschung beträchtlich vorangetrieben worden, und es sind mehrere neue Forschungsartikel erschienen. In den letzten Jahren fächerte sich jedoch die Erforschung der Mn-Toxizität in verschiedene Felder auf, wobei sehr detaillierte und komplexe Studiendesigns angewendet wurden. Insbesondere die Mechanismen der Mn-induzierten Nervenschädigung auf zellulärer und molekularer Ebene wurden genauer untersucht. Diskutiert wurden dabei Wechselwirkungen zwischen Neurotransmittern und Enzymen, Wirkmechanismen auf DNA-Ebene und auch die Einbeziehung genetischer Einflüsse. Ein wichtiges Thema war auch die Beschreibung spezieller Mn-Spezies, um so zu ermitteln, welches Molekül Mn an der Zellmembran transportiert und welches für die Schädigung des neuronalen Gewebes verantwortlich ist. Auch andere spezielle Schwerpunkte wie epidemiologische Studien wurden zunehmend wichtiger: Die betreffenden Arbeiten befassten sich mit Umwelteinflüssen von Mn insbesondere auf die Prävalenz der Parkinson-Krankheit sowie die Möglichkeit, Follow-up-Studien zur lebenslangen Exposition gegenüber Mn durchzuführen. Alle diese weit ausgreifenden Forschungsansätze können letztendlich dazu beitragen, mithilfe eines geeigneten

DOI von Original Artikel: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2013.08.005>.

[☆] Dieser Artikel wurde in Englisch als Invited Review im Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 28 (2014) publiziert. Aus dem Englischen von: Cornelia Schmutzler. E-Mail-Adresse: CABSchmutzler@aol.com. Deutsche Version online verfügbar seit: 24. Dezember 2013.

^{*} Korrespondierender Autor. Tel.: +49 (0)89 3187 4206; Fax: +49 (0)89 3187 3348.

E-Mail-Adresse: bernhard.michalke@helmholtz-muenchen.de (B. Michalke).

2211-968X/\$ – see front matter © 2014 Published by Elsevier GmbH.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.permed.2013.12.001>

Bio-Monitorings am Menschen in Zukunft das frühe Einsetzen von Manganismus zu verhindern oder zumindest rechtzeitig zu erkennen.

© 2014 Published by Elsevier GmbH.

Inhalt

Einleitung: aktuelle Forschung zu Mangan	110
Quellen der Mn-Exposition beim Menschen	111
Epidemiologische Studien: die Auswirkungen von Mangan auf die Bevölkerung	112
Situation bei Erwachsenen	112
Situation bei Kindern	113
Situation bei Säuglingen	113
Situation im Rentenalter	114
Toxikologische Untersuchungen zu Mangan auf molekularer und zellulärer Ebene	114
Barrieren und Transporter	114
Enzyme und ROS	115
Neurotransmitter	115
Molekulare Wechselwirkungen und Genetik	116
Schwerpunkt Mn-Spezies	117
Neuartiges Mn-Biomonitoring beim Menschen	118
Zukünftiger Bedarf	120
Offenlegung von Interessenkonflikten	121
Danksagung	121

Einleitung: aktuelle Forschung zu Mangan

Mn ist ein essenzieller Nährstoff, der an den biochemischen Reaktionen verschiedener Enzyme, wie z. B. der Mn-abhängigen Superoxiddismutase, beteiligt ist [1]. Es spielt eine wichtige Rolle beim Eisenstoffwechsel und ist für eine normale Funktion des Gehirns erforderlich. Trotz der wichtigen physiologischen Funktion des Mn kann ein erhöhter Spiegel zu toxischen Effekten auf das Nervensystem führen, die vermutlich über Mechanismen des oxidativen Stresses verursacht werden, wobei sich berufsbedingte Gesundheitsschäden hauptsächlich auf Inhalation zurückführen lassen [2]. Diese neurotoxischen Effekte lösen eine Reihe von Symptomen aus, wie z. B. Adynamie/schnelle Ermüdbarkeit, Sialorrhoe, Zephalalgie, Schlafstörungen, Muskelschmerzen und -hypertonie, maskenähnliches Gesicht, Gangänderungen, Koordinationsstörungen, Halluzinationen und mentale Reizbarkeit [3], die letztlich zu einer Mn-bedingten, Parkinson-ähnlichen Erkrankung führen, die als Manganismus bezeichnet wird.

Anders als bei der Parkinson-Krankheit (PK) ist bei Manganismus der Tremor weniger stark ausgeprägt, postural und durch eine höhere Frequenz, aber eine geringere Amplitude gekennzeichnet, und die Patienten zeigen kein anhaltendes Ansprechen auf Dopaminersatztherapie. Magnetresonanztomographische (MRT) Aufnahmen bei PK-Patienten sind normal, während die Scans nach Mn-Intoxikation beidseitig eine Änderung des „hohen“ Signals im Globus pallidus, Striatum und der Substantia nigra zeigen. Dagegen sind Fluordopa-Scans mittels Positronenemissionstomographie bei Mn-Intoxikation normal, während bei PK eine geringere Aufnahme in das posteriore Putamen zu beobachten ist [2].

Generell haben sich die Szenarien der Mn-Exposition innerhalb des letzten Jahrhunderts verändert, und zwar von der akuten Exposition gegenüber hohen Mn-Mengen,

die verantwortlich für das Auftreten von Manganismus ist, hin zur chronischen geringgradigen Exposition. Einerseits geht diese Veränderung vermutlich auf verbesserte Arbeitsschutzmaßnahmen für Arbeiter zurück, die potenziell hohen Mn-Mengen ausgesetzt sind, wie z. B. Schweißer, Schmelzer, Arbeiter in Batteriefabriken usw., was sich durch weniger Fälle von akutem Manganismus bemerkbar macht. Andererseits lässt sich eine erhöhte, chronische Mn-Exposition von Bevölkerungsteilen beobachten, die im Umkreis von Industrieanlagen wohnen, die Mn-haltigen Staub ausstoßen, oder in der Nähe von vielbefahrenen Verkehrswegen mit Mn-haltigen Autoabgasen aus mit Methylcyclopentadienyl-Mangan-Tricarbonyl (MMT) versetztem Treibstoff. Eine derartige chronische Exposition kann schließlich eine Ausweitung der Mn-Deposition über den Globus pallidus hinaus auf den gesamten Bereich der Basalganglien zur Folge haben, einschließlich der Pars compacta der Substantia nigra, die bei der PK betroffen ist [4].

Bei der Suche nach den Quellen und den Folgen dieser chronischen Exposition haben sich die Untersuchungen in der letzten Zeit auf drei Hauptthemen konzentriert, von denen wiederum jedes verschiedene Forschungsfelder umfasst:

- (1) Epidemiologische Studien zur Mn-Exposition und den damit verbundenen Gesundheitsrisiken, einschließlich einer erhöhten Prävalenz der Parkinson-Krankheit, auch unter Berücksichtigung einer lebenslangen Exposition
- (2) Untersuchungen zu molekularen Interaktionen und Mechanismen, wie z. B. die in jüngerer Zeit durchgeführten toxikologischen Arbeiten zu Mn auf zellulärer Ebene, zur Mn-Speziation im Liquor und in neuronalem Gewebe sowie zu Mn-Transportern in Zellmembranen
- (3) Versuche zur Verbesserung des Mn-Biomonitorings beim Menschen

Es ist offensichtlich, dass sich diese Hauptthemen z. T. überlappen. Daher leisten kürzlich veröffentlichte Artikel häufig auch Beiträge zu mehr als einem dieser Felder.

Es ist jedoch erwähnenswert, dass alle Arten von Untersuchungen zur Toxizität von Mn in irgendeiner Weise auf einer zuverlässigen Element- oder Speziesbestimmung beruhen. Daher sollte betont werden, dass es bei der Gewinnung von Proben und beim Umgang damit sehr leicht zur Kontamination kommen kann. Darüber hinaus können Messmethoden wie die ICP-qMS und andere durch Interferenzen gestört oder durch hochkonzentrierte Elemente in der Matrix beeinflusst werden. Die in der Übersicht behandelten Artikel enthielten entweder Angaben zur Qualitätskontrolle oder waren solide verfasst, so dass es keinen Anlass gab, aufgrund einer beeinträchtigten Analyse die Ergebnisse anzuzweifeln.

In den letzten 5-7 Jahren wurde eine Reihe sehr informativer Übersichtsartikel über Mn publiziert. Neben neuen Befunden, die bis zur Veröffentlichung dieser Reviews bekannt geworden waren, behandelten sie u. a. auch Basiswissen über Manganismus und die Toxikologie von Mn, einschließlich einiger grundlegender Mechanismen, Resorption, Verteilung, Exkretion und damit auch die entsprechenden biologischen Halbwertszeiten sowie schließlich die typischen Mn-Spiegel in Körperflüssigkeiten oder Geweben des Menschen. Diese grundlegenden und immer noch gültigen Informationen werden hier nicht wieder aufgegriffen, und der interessierte Leser sei an diese früheren vergleichenden Übersichtsartikel verwiesen [5–10]. Die vorliegende Arbeit enthält daher nur eine kurze Zusammenfassung zu Szenarios der Mn-Exposition und befasst sich v. a. mit neueren Ansätzen der Mn-Forschung, einschließlich der Mn-Speziation.

Quellen der Mn-Exposition beim Menschen

Mangan tritt in der Natur in einer Vielzahl geologischer Umfelder als Bestandteil von mehr als 30 Manganoxidmineralien auf, am häufigsten in Form seiner unlöslichen Oxide MnO_2 und Mn_3O_4 [11]. Hohe Mn-Gehalte finden sich daher in Böden, die durch Erosion von Erdkrustengestein entstanden sind, was in der Folge zur Mn-Deposition in Pflanzen führt.

Die durchschnittliche tägliche Aufnahme von Mn beträgt in den USA, England und den Niederlanden bei Standardernährung zwischen 2,3 und 8,8 mg pro Tag, wobei 2-3 mg Mn pro Tag für Erwachsene als ausreichend, 8-9 mg Mn pro Tag als vollkommen sicher gelten [12]. Der WHO zufolge wurden die höchsten Mn-Konzentrationen in bestimmten Nahrungsmitteln pflanzlicher Herkunft gefunden, wie z. B. Weizen und Reis (zwischen 10 mg/kg und 100 mg/kg) sowie in Teeblättern [13]. Eine in Kanada durchgeführte Studie zeigte, dass etwa 54% des über die Nahrung aufgenommenen Mn aus Getreide stammte [14]. In der allgemeinen Bevölkerung kam es zur Exposition gegenüber Mn durch den Verzehr kontaminierter Nahrungsmittel oder durch kontaminiertes Trinkwasser [15–17]. Die Mn-Konzentration in Nahrungsmitteln variiert jedoch von Land zu Land und von Region zu Region. Eine Studie in Westbengalen, Indien, ergab wesentlich höhere mittlere Mn-Gehalte in Gewürzen als in Getreide, Backwaren oder Gemüse (Werte: Gemüse 3,29 und

4,19 mg/kg, Getreide und Backwaren 9,9 und 12,7 mg/kg und Gewürze 42,4 und 54,2 mg/kg) [18].

Auch Trinkwasser kommt als Quelle für eine Mn-Überexposition in Frage, wie dies in manchen Regionen Bangladeshs der Fall ist. Dort betrug die Höchstkonzentration an Mn 2,0 mg/l und lag somit viermal höher als der risikobasierte Trinkwasserwert der WHO [19]. Generell enthält Trinkwasser jedoch weniger als 100 $\mu\text{g Mn/l}$ [20]. Da die Aufnahme und Ausscheidung von Mn normalerweise genau reguliert werden, kommt eine Intoxikation mit Mn durch orale Aufnahme selten vor [21,22], wobei aber nicht vergessen werden sollte, dass die neurologischen Effekte einer chronischen Aufnahme von niedrig konzentriertem Mn mit der Nahrung oder dem Trinkwasser über einen längeren Zeitraum noch nicht vollständig aufgeklärt sind.

Dagegen ist bekannt, dass die Inhalation größerer Mn-Mengen zur Deposition von Mn im Striatum und im Cerebellum führt, da es aktiv durch den olfaktorischen Trakt transportiert wird [23]. Es besteht daher insbesondere bei Personen, die von Berufswegen Mn-Staub ausgesetzt sind, die Gefahr einer Intoxikation. Dazu zählen u. a. Beschäftigte von Betrieben, die Legierungen herstellen, wie z. B. Schweißer und Schmelzer oder Mitarbeiter in Fabriken, die Trockenbatterien fertigen [24,25], für die aktuell ein von der American Conference on Governmental Industrial Hygienists festgelegter Grenzwert (Threshold Limit Value, TLV) von 0,02 mg/m³ hinsichtlich des respiratorischen Anteils der Exposition gilt [26]. Nong et al. nutzten in einer Studie ein physiologie-basiertes pharmakokinetisches Modell Mn-exponierter (über Inhalation und Futter) Ratten und konnten zeigen, dass es bei einer Exposition gegenüber > 0,2 mg/m³ in manchen Hirnregionen zu einem präferentiellen Anstieg und einer raschen Rückkehr (innerhalb von 1 oder 2 Wochen) zum Steady-State-Wert kam [27]. Es muss erwähnt werden, dass einerseits die Konzentration und andererseits die Dauer der Exposition gegenüber Mn, die zum Auslösen eines ersten neurotoxischen Effekts erforderlich sind, immer noch Gegenstand der Debatte sind, da sie von einer Reihe individueller Faktoren abhängig sind (Alter, Geschlecht, Wohnort, Genetik, Ernährung usw.).

Interessanterweise ändern sich die Szenarien der Mn-Exposition von einer relativ hochgradigen berufsbedingten Exposition von Erwachsenen während ihres Arbeitslebens hin zu einem erhöhten Risiko für eine niedriggradige, chronische, umweltbedingte Exposition, von der Personen jeden Alters betroffen sind. Der Grund dafür ist die erhöhte Belastung der Umwelt durch Mn, die auf den Einsatz von Methylcyclopentadienyl-Mangan-Tricarbonyl (MMT) als Antiklopfmittel in Treibstoff zurückgeht [28–31]. Es wurde auch über Fälle einer versehentlichen Exposition gegenüber Mn berichtet, die bei der Herstellung illegaler Drogen im Heimlabor auftraten, sowie über die Kontamination von Früchten und Gemüse durch das Mn-haltige Fungizid Maneb [32–34]. Es gelangen also ständig neue Substanzen in die gesamte Umwelt, und die Kontamination von Böden und Gewässern durch industrielle Emissionen kann über eine kombinierte Exposition zu kumulativer Neurotoxizität führen [34]. Dazu kann es bereits im Säuglingsalter kommen, da Säuglingsnahrung deutlich größere Mengen an Mn enthält (70,0-1289,0 $\mu\text{g/l}$) als Muttermilch (durchschnittlich 4,9 $\mu\text{g/l}$) oder Kuhmilch (durchschnittlich 25,2 $\mu\text{g/l}$) [5,35]. Die Auswirkungen der umweltbedingten Mn-Exposition sind

daher ein neu aufkommendes Forschungsthema, das insbesondere für die Epidemiologie von Interesse ist, die eine Vielzahl unterschiedlicher Bevölkerungsgruppen über einen längeren Zeitraum beobachtet.

Epidemiologische Studien: die Auswirkungen von Mangan auf die Bevölkerung

Historisch gesehen wurde Manganismus stets mit der Mn-Intoxikation von Minenarbeitern, Industriearbeitern oder Schweißern in Verbindung gebracht, die während ihres Arbeitslebens berufsbedingt hohen Konzentrationen von Mn-Staub ausgesetzt waren. In der jetzigen Situation jedoch, die durch weltweit steigende Emissionen seitens der Industrie sowie den Einsatz von Mn in Fungiziden (Maneb, Mancozeb) oder als Treibstoffzusatz (MMT) in einigen Ländern gekennzeichnet ist, nehmen die Quellen für eine umweltbedingte Exposition gegenüber Mn zu. Infolgedessen wird das Problem der Neurotoxizität von Mn aufgrund einer Reihe unterschiedlicher Faktoren für verschiedene Bevölkerungsgruppen zunehmend ein Problem der öffentlichen Gesundheit [36].

Situation bei Erwachsenen

Die Gruppe um Lucchini hat während der letzten Jahre in der Provinz Brescia in Italien eine breit angelegte Studie zu den Effekten einer umweltbedingten Mn-Exposition auf die Bevölkerung durchgeführt. Die Gruppe begann damit, die Prävalenz Parkinson-ähnlicher Störungen in Abhängigkeit von der umweltbedingten Exposition gegenüber Mn durch vier verschiedene - Eisenlegierungen erzeugende - Fabriken in dieser Provinz zu untersuchen, die bis 2001 in Betrieb waren [37]. Daher wurde in allen Gemeinden die Mn-Konzentration in den Staubablagerungen gemessen. Es stellte sich heraus, dass die Mn-Konzentration in der Umgebung der Industriebetriebe und windabwärts davon signifikant erhöht war. Darüber hinaus zeigten die Ergebnisse, dass eine umweltbedingte Exposition gegenüber Mn mit einer erhöhten Prävalenz Parkinson-ähnlicher Störungen verbunden ist. Dieses Auftreten von Parkinson-ähnlichen Störungen kann auch mit genetischen Faktoren in Zusammenhang stehen. Daher entwickelten Lucchini et al. ein Konzept der Suszeptibilität, anhand dessen sich Personen als für PK anfällig klassifizieren lassen [4]. So wurden Mutationen von Genen diskutiert, die sowohl bei der Pathogenese des Parkinsonismus als auch bei der Regulation des Mn-Transports und -Metabolismus eine wichtige Rolle spielen. Obwohl beim Menschen homöostatische Mechanismen dafür sorgen, dass die Absorptions- und die Exkretionsrate ständig aneinander angepasst werden, um den Mn-Spiegel im physiologischen Bereich zu halten und einen Mangel oder eine Intoxikation zu vermeiden, wies Lucchinis Gruppe eine subklinische und subfunktionelle Verschlechterung der Leistung bei neuropsychologischen Tests nach. Diese betraf hauptsächlich die motorische Koordination feiner Bewegungen im Zusammenhang mit einer niedriggradigen Exposition. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine chronische, lebenslange Exposition gegenüber sehr geringen Mn-Mengen ein Risikofaktor für das Auftreten der PK sein könnte.

Auf die Möglichkeit zusätzlicher Manifestationen der Mn-Neurotoxizität über den Manganismus hinaus wurde zum ersten Mal in einer Studie an 953 neu diagnostizierten Fällen von PK hingewiesen, unter denen sich 15 Personen befanden, die von Beruf Schweißer waren. Diese Untergruppe war zum Zeitpunkt der Diagnose 17 Jahre jünger als die Gruppe der Nicht-Schweißer [38]. Diese „untypische“ Mn-bedingte Neurotoxizität konnte durch den Befund erklärt werden, dass ein Carrier-vermittelter Influx ins Gehirn und ein diffusionsvermittelter Efflux eine Mn-Überladung im Gehirn mit verlängerter übermäßiger Exposition und verlängerter, sehr niedriggradiger Exposition verursachen [4].

Auf der Grundlage dieser kürzlich durchgeführten epidemiologischen Untersuchungen entwickelten Lucchini et al. das Konzept der lebenslangen Mn-Exposition zusammen mit der Hypothese eines erhöhten Risikos für Parkinson-ähnliche Störungen, die besagt, dass eine lebenslange Exposition gegenüber geringen Mengen an Mn, die bereits vor der Geburt beginnt und bis ins Alter andauert, ein Risikofaktor für Parkinsonismus sein könnte. Der Mechanismus der Mn-Neurotoxizität bei chronischer niedriggradiger Exposition ist bisher jedoch noch nicht ausreichend bekannt. Daher weisen die Autoren auch darauf hin, dass Leberfunktionsstörungen für die Mn-bedingte Neurotoxizität als wichtiger Faktor in Betracht gezogen werden müssen. Außerdem lenkten Sie die Aufmerksamkeit auf die Notwendigkeit, zu untersuchen, ob GABAerge (GABA = Gamma-Aminobuttersäure) Neuronen oder der Glutamattransport durch bestimmte Mn-Spezies beeinflusst werden [4].

In einer Folgestudie setzten Zacco et al. die Methode der Röntgenfluoreszenz ein, um in Proben von abgelagertem Staub, die in der gesamten Provinz gesammelt worden waren, Schwermetalle zu identifizieren und eine systematische Kartierung durchzuführen [39]. Die Kartierung ergab, dass Mn und andere Metalle in den Gemeinden, in denen die vier eisenverarbeitenden Fabriken standen, häufiger im Staub vorkamen. Besonders hohe Konzentrationen wurden im nördlichen Teil der Provinz gefunden, der Valcamonica genannt wird und in dem drei der vier Fabriken betrieben worden waren. Die Autoren argumentierten, dass Luftemissionen und Abwässer dieser Betriebe deren Umgebung verschmutzten. In einer weiteren Studie verglichen Squitti et al. Parkinson-Patienten mit Nicht-Parkinson-Patienten (Kontrollen), jeweils zwei Gruppen mit Einwohnern der Region Valcamonica und des übrigen Teils von Brescia [40]. Patienten, die in Valcamonica lebten, wiesen im Vergleich zu den Kontrollpersonen aus Valcamonica und den Patienten und Kontrollpersonen aus der übrigen Provinz eine höhere Cu-Konzentration sowie niedrigere Zn- und Fe-Spiegel im Serum auf. Interessanterweise waren bei den Patienten und Kontrollpersonen aus Valcamonica auch die Mn-Spiegel im Blut und Urin höher als bei den Patienten und Kontrollpersonen aus der übrigen Provinz. Die Autoren zogen den Schluss, dass in dieser Region die lebenslange Exposition gegenüber Mn das Risiko für neurodegenerative Störungen aufgrund von Ungleichgewichten bei Metallkonzentrationen (Cu, Fe, Zn) erhöhen kann, insbesondere bei gleichzeitigem Vorliegen einer subklinischen Leberfunktionsstörung. Es ist jedoch noch nicht endgültig geklärt, ob die Änderung des Cu-, Fe- und Zn-Spiegels die Ursache für das erhöhte Risiko oder ob diese Ungleichgewichte die Folge des pathologischen Prozesses ist. Eine weitere epidemiologische Studie

wurde in Toronto und Hamilton in Kanada durchgeführt. Die Untersuchungen befassten sich mit dem Zusammenhang zwischen der PK und der Exposition gegenüber Mn aus industriellen Emissionen sowie aus MMT in Fahrzeugabgasen, das in Kanada seit 1976 Treibstoffen zugesetzt wird [41]. Den Autoren zufolge betrug das Chancenverhältnis (Odds Ratio) für die Diagnose einer PK durch einen Arzt 1,034 für einen Anstieg der gesamten Mn-Schwebeteilchen um 10 ng/m^3 . Daher folgerten Finkelstein und Jerrett [41], dass die Exposition gegenüber Mn in der Umwelt das Alter bei der Diagnose einer PK herabsetzt. Dies stützt die Hypothese, dass eine Exposition gegenüber Mn den natürlichen Verlust von Neuronen im Verlauf des Alterungsprozesses vorantreiben kann. Diese Befunde und Schlussfolgerungen von Finkelstein und Jerrett [41] standen im Einklang mit der oben erwähnten Hypothese eines erhöhten Risikos für Parkinson-ähnliche Störungen nach lebenslanger Mn-Exposition, wie sie von Lucchini et al. [4] formuliert worden war.

Situation bei Kindern

In einer neueren Studie zeigten Zoni et al., ebenfalls in der Region Valcamonica, dass Mn bei verschiedenen Altersgruppen, z. B. Kindern und älteren Menschen, eine Störung der olfaktorischen Funktion und der motorischen Koordination verursachen kann, da Mn durch den olfaktorischen Trakt transportiert wird und zu dopaminergischer Dysregulation führt [23]. Der Effekt der hohen Umweltkonzentration von Mn in Valcamonica war auch im Hinblick auf die jüngere Bevölkerung von Interesse. Daher führten Lucchini et al. verhaltensneurologische Tests bei Heranwachsenden (Alter 11-14 Jahre) aus der Region Valcamonica durch. Den Autoren zufolge war bei diesen Schülern eine deutliche Beeinträchtigung der motorischen Koordination, der Handgeschicklichkeit und der Geruchswahrnehmung zu beobachten, die mit dem Mn-Gehalt im Boden in Zusammenhang stand. Darüber hinaus war die Tremor-Intensität positiv mit dem Mn-Gehalt in Blut und Haaren korreliert [42]. Diese Daten unterstreichen, dass auch eine historische Mn-Belastung der Umwelt durch Eisenlegierungen herstellenden Betrieben bei Heranwachsenden zu olfaktorischer und motorischer Dysfunktion führen kann. Lucchini et al. nahmen jedoch an, dass eine derart niedriggradige Mn-Exposition keine kognitiven Effekte bei Heranwachsenden haben dürfte [43]. Die Auswirkungen von Mn im Trinkwasser bei Kindern wurden auch in einer in Quebec, Kanada, durchgeführten Studie untersucht. In dieser Studie von Bouchard et al. zeigte sich bei Schülern, die zu Hause Wasser mit einer höheren Mn-Konzentration erhielten ($610 \mu\text{g/l}$ vs. $160 \mu\text{g/l}$ bei einer zweiten Gruppe), eine höhere Prävalenz von oppositionellem und hyperaktivem Verhalten [17]. Die Autoren wiesen daher auf die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen zu den Risiken einer Mn-Exposition über das Trinkwasser hin. In einer zweiten Studie fanden dieselben Autoren, dass die Mn-Aufnahme über das Leitungswasser positiv mit Beeinträchtigungen bei Schulkindern im Alter von 6-13 Jahren korrelierte. So war beispielsweise ein 10-facher Anstieg des Mn-Gehalts im Wasser mit einer Abnahme des IQ um 2,4 Punkte verbunden ($p < 0,01$), wobei die mediane Mn-Konzentration im Trinkwasser $34 \mu\text{g/l}$ (Bereich: $1\text{-}2700 \mu\text{g/l}$) betrug [44].

Situation bei Säuglingen

Bei Neugeborenen besteht aufgrund einer höheren Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und einer geringeren Gallenexkretion ein sogar noch höheres Risiko. Daher sind Untersuchungen zur Mn-Exposition von Säuglingen unbedingt erforderlich. Eine der wenigen Studien zur Mn-Exposition an Säuglingen wurde von Zota et al. im County Ottawa in Oklahoma, USA, durchgeführt. Hierbei wurde an einer Kohorte von 470 Mutter-Kind-Paaren der Zusammenhang zwischen dem Mn-Spiegel im mütterlichen und Nabelschnurblut einerseits und dem Geburtsgewicht andererseits untersucht [45]. Bei dieser Studie wurde ein nicht-linearer Zusammenhang zwischen dem Mn-Spiegel im mütterlichen Blut und dem Geburtsgewicht reifer Säuglinge beobachtet. Das Geburtsgewicht stieg bei Mn-Spiegeln von bis zu $3,1 \mu\text{g/l}$ an, bei höheren Spiegeln war dagegen ein leicht reduziertes Geburtsgewicht zu beobachten. Daher wurde die Durchführung einer solchen Studie bei stärker exponierten Populationen empfohlen, um ein klareres Korrelationsmuster herausarbeiten zu können. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass der Mn-Spiegel im Blut schwangerer Frauen aus physiologischen Gründen erhöht zu sein scheint [46]. Vor diesem Hintergrund versuchten Ljung et al. den mütterlichen Mn-Spiegel mit dem Expositionsgrad ihrer gestillten Babys zu korrelieren. Die Studie wurde in einer Region Bangladeshs durchgeführt, in der der Mn-Gehalt im Wasser den Richtwert der WHO um etwa 40 % übersteigt. Die Mn-Konzentration im Urin der Mütter korrelierte mit der im Wasser, jedoch nicht mit der im Blut oder der Muttermilch. Interessanterweise führte eine erhöhte Mn-Exposition der Mütter nicht notwendigerweise zu einer übermäßigen Exposition der gestillten Kinder [47]. Daher betonten die Autoren die Bedeutung des Stillens auch in stark Mn-belasteten Regionen. Es muss im Auge behalten werden, dass die Aufnahme von Mn mit der Nahrung oder dem Trinkwasser und seine Verteilung im Körper individuell stark unterschiedlich reguliert werden, ebenso wie das Ausmaß, in dem Mn von Müttern an ihre Kinder weitergegeben wird. Man weiß, dass das Gehirn während der frühen Entwicklungsphasen Mn als Bestandteil wichtiger Metalloenzyme benötigt, darunter die Arginase, Glutaminsynthetase, Pyruvatcarboxylase und Superoxiddismutase. Trotzdem kann eine pränatale oder postnatale Mn-Überexposition des Fetus oder des Neugeborenen schwerwiegende Folgen für das sich entwickelnde Kind haben und möglicherweise auch den Fetus schädigen [45]. Experimente an Tiermodellen haben bereits Hinweise darauf ergeben, dass Neurotoxizität während der pränatalen und frühen postnatalen Phase entweder direkt eine Reduktion der Anzahl dopaminergischer Neuronen oder aber eine erhöhte Suszeptibilität dieser Neuronen für eine Degeneration nach späteren negativen Umwelteinflüssen (wie im Fall der Valcamonica-Region) oder infolge des Alterungsprozesses allein verursachen kann [34,48]. Der Einfluss einer Exposition gegenüber mehreren Chemikalien bereits in der frühen Kindheit stand im Mittelpunkt einer Arbeit von Henn et al. [49]. Bei einer Längsschnittstudie in Mexiko City wurden 455 Kinder bei der Geburt aufgenommen und bis zum Alter von 36 Monaten beobachtet, wobei ihnen Blutproben zur Bestimmung von Pb und Mn abgenommen wurden. Es ergaben sich Belege für einen Synergismus zwischen Pb und Mn, wobei die Toxizität von Pb bei Kindern unter hoher

Mn-Koexposition erhöht war. Henn et al. schlugen vor, dass die gleichzeitige Exposition gegenüber beiden Metallen mit stärkeren Defiziten sowohl bei der mentalen als auch bei der psychomotorischen Entwicklung verbunden ist als die Exposition gegenüber einem der Metalle allein. Diesen Autoren zufolge stellt das Alter von 12 Monaten ein sensitives Entwicklungsfenster speziell im Hinblick auf diesen Pb-Mn-Synergismus dar, da er nur in diesem Alter, nicht aber in einem Alter von 24 Monaten beobachtet wurde. Die Autoren betonten die Bedeutung der Einbeziehung kombinierter Effekte von Chemikalien in die Risikobewertung und öffentliche Gesundheitsinterventionen, insbesondere in Regionen, wo die Umwelt durch Mn und Pb gleichzeitig belastet ist. Diese Studie wurde teilweise bei einem Symposium vorgestellt, das sich mit Mn-bedingten kognitiven und motorischen Veränderungen befasste und im Artikel von Roels et al. [46] zusammengefasst ist.

Situation im Rentenalter

Über Effekte einer berufsbedingten Mn-Exposition lange nach einer dauerhaften Berufstätigkeit, die mit respiratorischer Exposition gegenüber einer bestimmten Mn-Menge verbunden war, wird nur selten berichtet. Erwähnenswert ist die Arbeit von Bourchard et al., die im Jahr 2004 in Quebec, Kanada, an Arbeitern, die während ihres früheren Arbeitslebens gegenüber Mn exponiert gewesen waren, eine Folgestudie zu einer Studie aus dem Jahr 1990 durchführten. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass eine frühere Exposition gegenüber Mn dauerhafte Folgen in Form von neuropsychiatrischen Symptomen auslösen kann, da diese Arbeiter auf Bewertungsskalen für Angst, Feinseligkeit und Depression höhere Werte aufwiesen als die Kontrollpersonen [50]. Diese Befunde rücken andere neurologische Auswirkungen der Mn-Intoxikation als die Schädigung von Neuronen, in den Brennpunkt, nämlich psychologische Effekte, und betonen die Gefahren von Mn auch noch lange Zeit nach einer akuten Exposition. So ist heute bekannt, dass Neurotoxizität in zweierlei Hinsicht zeitabhängig ist: einerseits von der Dauer der Exposition, andererseits von der Lebensphase, zu der sie stattfindet [34].

Aufgrund der sich ändernden Umstände der Exposition gegenüber Mn - von der berufsbedingten hin zur umweltbedingten Exposition - steigt der Bedarf an epidemiologischen Studien, die eine geeignete Risikobewertung liefern und in denen Tests von der berufstätigen Bevölkerung auf andere vulnerable Bevölkerungsgruppen wie ältere Menschen und Kinder ausdehnt werden [51].

Toxikologische Untersuchungen zu Mangan auf molekularer und zellulärer Ebene

Mangan ist seit mittlerweile 175 Jahren als neurotoxische Substanz bekannt. Die auf eine Mn-Intoxikation folgende Erkrankung namens Manganismus wurde zum ersten Mal 1837 von James Couper beschrieben, der bei fünf schottischen Arbeitern, die MnO₂-Erz zerkleinerten, Paraplegie v. a. in den unteren Extremitäten beobachtete [52]. Seither wurde eine Vielzahl von Studien durchgeführt, in denen die Symptome einer Mn-Intoxikation beim Menschen beschrieben wurden sowie die Effekte bei Nagern und in

Zellkulturmodellen. Eine sehr gute Zusammenfassung dieser Arbeiten zu den neuropathologischen Effekten der Mn-Exposition wurde von Ashner et al. [6] publiziert. Sie befasst sich schwerpunktmäßig mit Mechanismen des Mn-Transports, Effekten von Mn auf Neurotransmittersysteme sowie mit seinen negativen Auswirkungen auf die Mitochondrienfunktion und den zellulären Energiestoffwechsel.

Barrieren und Transporter

Dem aktuellen Kenntnisstand entsprechend handelt es sich bei den Regionen im Gehirn, die von der Mn-Akkumulation bei Manganismus hauptsächlich betroffen sind, um den Globus pallidus und die Substantia nigra, wobei letztere bekanntermaßen auch bei Parkinsonismus eine Rolle spielt. Diese Regionen, so wird angenommen, sind vernetzt mit anderen Basalganglien, d. h. dem Nucleus caudatus, dem Putamen, dem Nucleus accumbens und dem Nucleus subthalamicus [53]. Zwischen diesen Regionen wirkt sich Mn im Wesentlichen auf dopaminerge und GABAerge Signalwege aus und führt daher zu Defiziten bei kognitiven Funktionen sowie zu motorischen Störungen wie Bradykinese, Rigor, Tremor, Gangstörungen, Gleichgewichtsstörungen und Dystonie und/oder Ataxie [54]. Trotzdem ist der genaue Mechanismus der Mn-Aufnahme ins Gehirn noch nicht bekannt. In einer aktuellen Studie von Bornhorst et al. an porcinen In-vitro-Modellen wurde der Effekt von MnCl₂ auf die Blut-Liquor-Schranke (blood-cerebrospinal fluid barrier, BCB) und die Blut-Hirn-Schranke (blood-brain barrier, BBB) untersucht. Es zeigte sich, dass Mn die BCB stärker beeinflusst als die BBB, weshalb angenommen wurde, dass nach oraler Aufnahme die Passage durch die BCB die bevorzugte Route für den Transport von Mn ins Gehirn ist. Es muss jedoch noch genauer geklärt werden, ob die mithilfe dieses Zellmodells erhaltenen Ergebnisse einfach auf die orale Aufnahme von Mn und darüber hinaus auch auf Mechanismen der Mn-Aufnahme in vivo, z. B. durch Inhalation, übertragen werden können. Durch eine Nachinkubation der BCB mit Ca konnte der negative Effekt von Mn auf diese Barriere teilweise rückgängig gemacht werden [55]. Dies eröffnet (erneut) ein weiteres interessantes Forschungsfeld, das der mechanistischen Interaktionen von Mn mit anderen Ionen/Elementen in der geschädigten Region.

Derzeit herrscht Konsensus darüber, dass die Resorption, der Transport und die Gewebespiegel von Mn strikt reguliert werden und Mn die neuronalen Barrieren über verschiedene Carrier und in unterschiedlichen Oxidationsstufen passieren kann [56]. Obwohl der Mn-Transport über die BBB im Hinblick auf die primär aktiven Transportersysteme intensiv untersucht wurde, gibt es dazu derzeit noch kein schlüssiges Ergebnis [56,57], da sich die Daten in den Publikationen der verschiedenen Forschergruppen immer noch widersprechen. Ashner et al. [7] stellen fest: „Derzeit legen die überzeugendsten evidenzbasierten Studien über Mn eine physiologische Rolle für den Transport von Mn sowohl durch den Transferrinrezeptor (TfR) als auch durch DMT-1 nahe“, was im Einklang steht mit verschiedenen an Ratten durchgeführten Studien von Au et al. [58] und Wang et al. [59]. Im Gegensatz dazu bemerkt Yokel [3], dass „die Rolle von DMT-1 weiterhin umstritten ist. Es gibt Belege gegen, jedoch keine direkten Belege für seine Beteiligung.“ Diese Feststellungen

stimmen eher mit denen von Crossgrove und Zheng [10] und denen von Crossgrove und Yokel [60] überein sowie mit den Resultaten von Bornhorst et al. [55], die befanden, dass „DMT-1 bei der Aufnahme von Mn ins Gehirn über die Blut-Liquor-Schranke nicht der wichtigste Transporter ist.“

Abgesehen vom kontrovers diskutierten DMT-1, beobachteten Wang et al. eine Hochregulation von MTP1 (Metalltransportprotein 1) und des Transports mittels TfR im isolierten Plexus chorioideus der Ratte (der die Blut-Liquor-Schranke umfasst) als eine frühe Gewebeanwort auf eine Exposition gegenüber Mn oder Fe [61]. Des Weiteren kann Mn von den divalenten Metall-Bicarbonationen-Symportern ZIP8 und ZIP14, von verschiedenen Calciumkanälen, von der Familie SLC39 (Solute Carrier 39) von Zinktransportern, von park9/ATP13A2, vom Magnesiumtransporter hip14 und von den TRPM7-Kanälen/-Transportern (Transient Receptor Potential Melastatin 7) transportiert werden [56].

Gitler et al. [62] haben vor kurzem berichtet, dass das *PARK9*-Gen, das für das frühe Ausbrechen des Parkinsonismus verantwortlich ist, ebenfalls Mn transportiert. Es codiert für ein mutmaßliches Transmembran-ATPase-Protein vom P-Typ. Darüber hinaus haben die Mitglieder der SLC39-Familie von Metallionentransportern eine hohe Affinität für Mn. Ihr K_m von $2,2 \mu\text{M}$ für Mn^{2+} lag nahe bei der physiologischen Konzentration [7]. Schließlich scheint auch der Citrat-Transporter am Mn-Transport über die BBB beteiligt zu sein [56]. Es ist vorgeschlagen worden, dass ein dreizähliger Mn-Citrat-Komplex mit einer nicht-koordinierten zentralen Carboxylat-Erkennungsstelle ein Substrat des Transporters für organische Anionen oder eines Monocarboxylat-Transporters (MCT) sein könnte. Da die Aufnahme von Mn-Citrat aus einem Medium mit pH-Wert 6,9 effektiver war als aus einem Medium mit pH-Wert 7,4, wurde ein H^+ -abhängiger Mechanismus angenommen [3], der damit vereinbar wäre, dass MCT-1 die Aufnahme von Mn-Citrat vermittelt. Darüber hinaus könnten u. U. noch weitere zelluläre Prozesse an der Regulation der Aktivität obenerwählter Transporter in Antwort auf Mn-Mangel oder -Überladung beteiligt sein. Schließlich spekulierten Jursa und Smith [63], dass Ceruloplasmin im Gehirn eine Rolle beim Efflux von Mn spielen könnte.

Enzyme und ROS

Es wird angenommen, dass neben der Akkumulation von Mn im Gehirn auch die Induktion von oxidativem Stress in den betroffenen Gehirnregionen eine Rolle bei der Neurotoxizität von Mn spielt. Mn ist ein Kofaktor einiger wichtiger Enzyme, die an der Erhaltung des oxidativen Gleichgewichts beteiligt sind, wie z. B. der Superoxiddismutase (SOD) [64] oder der Acetylcholinesterase (AChE). Bei einer Studie an Neuroblastomzellen, die mit MnCl_2 behandelt wurden (200 und $800 \mu\text{M}$), zeigte sich eine signifikante Abnahme der spezifischen Aktivität der Mn-SOD, Cu/Zn-SOD, der Katalase (CAT) und der Glutathionperoxidase (GPx). Interessanterweise erhöhte die Kultivierung dieser Zellen in Anwesenheit von Silymarin die Aktivität signifikant, was nahe legt, dass Silymarin Schutz gegen Mn-Toxizität bieten könnte [65]. Dies eröffnet ein mögliches neues Anwendungsfeld für Silymarin bei der Prävention des Manganismus und sollte daher weiter untersucht werden.

Bei einer neueren Studie von Santos et al. erhielten Ratten 4 bzw. 8 i.p. Injektionen von MnCl_2 (25 mg/kg pro Tag). In beiden Gruppen nahm die AChE-Aktivität signifikant ab. Die Konzentration an Mn-SOD-Protein dagegen nahm infolge der Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS) signifikant zu, was auch für die F2-Isoprostan-(F2-IsoP-) und Prostaglandin-2-(PGE2-) Spiegel im Gehirn galt, bei denen es sich um Entzündungsmediatoren handelt. Die F2-IsoP-Spiegel waren auch bei der Studie von Milatovic et al. in vitro und in vivo erhöht [67]. Hierbei wurden primäre kortikale Neuronen von Ratten für 2 h mit $500 \mu\text{M}$ Mn behandelt, was auch zu einer ATP-Depletion führte. Vorbehandlung mit dem Vitamin-E-Analog Trolox oder mit Indomethacin schützte die Neuronen vor den Mn-induzierten oxidativen Effekten. Andererseits führte eine 24-stündige Mn-Exposition bei Mäusen zu einer progressiven Degeneration der Wirbelsäule und einer Schädigung der Dendriten der Medium-Spiny-Neuronen. Diese Effekte wurden durch Vorbehandlung der Mäuse mit Vitamin E oder Ibuprofen gemildert. Daher schlugen die Autoren vor, eine Verringerung des oxidativen Stresses und die Kontrolle oxidativer Biomarker könnte eine therapeutische Strategie bei Mn-induzierter dopaminergischer Schädigung sein.

Was die AChE-Expression bei Mn-substituierten Ratten betrifft, ist der entscheidende Parameter die Dauer der Behandlung. Bei einigen Studien zeigte sich nach Anwendung hoher subakuter Dosen von Mn ein Anstieg der AChE-Aktivität [65,68,69], während eine chronische Behandlung über einen längeren Zeitraum zu einer Abnahme der AChE-Aktivität führte [66,70,71]. Der Anstieg der AChE-Aktivität könnte ein Schutzmechanismus der Neuronen bei akuter Mn-Aufnahme sein, der jedoch bei längerer Exposition gegenüber diesem neurotoxischen Metall versagt.

Neurotransmitter

Mn ist nicht nur ein Kofaktor für wichtige antioxidative Enzyme, sondern auch für Enzyme, die an der Synthese (z. B. Glutaminsynthese) oder am Metabolismus von Neurotransmittern beteiligt sind [7]. Der Einfluss von Mn auf die Regulation von Glutamat und GABA ist in [72] zusammengefasst. Wie diesem Übersichtsartikel zu entnehmen ist, gibt es widersprüchliche Daten dazu, ob die Akkumulation von Mn zur Erhöhung oder zur Abnahme der regionalen GABA-Spiegel führt, jedoch steht es außer Frage, dass die GABAergen Systeme der Basalganglien betroffen sind. Eine neuere Studie aus dem Jahr 2007 ergab in der Tat, dass bei weiblichen und männlichen Ratten nach 6 Wochen Behandlung mit Mn die Aufnahme von Mn ins Gehirn mit der Aufnahme von GABA in umgekehrter Beziehung stand [73]. Anderson et al. zeigten ebenfalls an einem Nager-Modell, dass eine Exposition gegenüber Mn infolge einer veränderten Expression von Transport- und Rezeptorproteinen einen Anstieg der extrazellulären GABA-Konzentration bewirkte [74]. Bei einer kürzlich von Crooks et al. durchgeführten Studie wurde ein Zellkulturmodell GABAerger Neuronen der Ratte verwendet, bei dem eine Behandlung mit Mn in geringer Konzentration fast keinen Einfluss auf den intrazellulären GABA-Spiegel hatte [75]. Im Gegensatz dazu stieg der intrazelluläre und extrazelluläre Glutamat-Spiegel während der Mn-Behandlung auf 170 %

bzw. 198% des jeweiligen Kontrollwerts, der extrazelluläre Glutamin-Spiegel dagegen sank auf 73% des Kontrollwerts. Alles in allem liegt der Fall bei GABA ähnlich wie bei der AchE-Aktivität: Die Auswirkungen auf das GABAerge System scheinen von der Dauer der Mn-Behandlung und der Mn-Konzentration abhängig zu sein. Eine Mn-Exposition ändert offensichtlich Glutamat- und GABA-Spiegel, darüber hinaus aber auch Aminosäure-Spiegel [76]. Dies könnte auf die komplexen Wechselwirkungen zwischen diesen Neurotransmittern, einschließlich Dopamin, zurückzuführen sein. Kürzlich wurden Studien mithilfe der Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie diskutiert, einer modernen Methode, die verbesserte Informationen über die Toxizität von Mn im Gehirn und die Implikationen für Transporter oder Neurotransmitter liefern könnte. Auf der Grundlage von Experimenten mit Radioliganden für Dopamintransporter wurde vorgeschlagen, dass die Konzentration von Dopamintransportern im Striatum von Parkinson-Patienten mit Mn-Exposition in der Vorgeschichte geringer ist [63,64]. Die Befunde führten zu der Annahme, dass dopaminerge Endigungen im Striatum nach Mn-Exposition degenerierten und dass darüber hinaus Dopamintransporter direkte Zielstrukturen Mn-induzierter Effekte sind. Wie in der Arbeit von Chen et al. [77] demonstriert, erhöhte eine akute systemische Behandlung mit Mn die Konzentration der Dopamintransporter. Andererseits hemmte bei der Studie von Guilarte et al. [78] eine chronische Mn-Exposition den stimulatorischen Effekt von Amphetaminen auf die Dopamin-Freisetzung. Es wurde vermutet, dass dies durch eine Mn-induzierte Inhibition von Dopamintransportern verursacht wurde. Solche Studien weisen darauf hin, dass die molekulare Bildgebung mittels Positronen-Emissionstomographie oder Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie eine wichtige Rolle bei der Erforschung der komplexen neurotoxischen Effekte von Mn am lebenden Gehirn spielen könnte [7].

Molekulare Wechselwirkungen und Genetik

Trotz der ambivalenten Beobachtungen auf Ebene der Neurotransmitter oder der Pathophysiologie wurden in den letzten Jahren auf molekularer Ebene aufschlussreiche Ergebnisse zur Neurotoxizität von Mn erhalten, da bisher nur wenig über die zellulären Reaktionen auf Mn bekannt ist.

So wurde z. B. der Einfluss von Mn auf die Aktivierung der Mikroglia in Ratten untersucht, die intrastratial injiziertes $MnCl_2$ erhalten hatten. Nach 7 Tagen waren Mikrogliazellen deutlich aktiviert, die Zahl TH-immunreaktiver Neuronen in der Substantia nigra dagegen stark reduziert. Darüber hinaus wurden als Anzeichen einer Antwort auf oxidativen Stress in den dopaminergen Neuronen der Substantia nigra die induzierbare Stickoxidsynthase, Tumornekrosefaktor α und Interleukin-1 β hochreguliert [79]. Außerdem konnte die Produktion der erwähnten Entzündungsmarker durch Behandlung mit Minocyclin, einem Inhibitor der Mikroglia-Aktivierung, verhindert werden. Neuere Arbeiten von Bornhorst et al. trugen zur weiteren Klärung des molekularen Mechanismus der Mn-induzierten Neurotoxizität bei. In ersten Experimenten zeigten sie, dass die Behandlung menschlicher Zellen (HeLa S3) mit $10 \mu M$ $MnCl_2$ keine Strangbrüche induzierte, ab einer Konzentration von $1 \mu M$ inhibierte Mn jedoch stark die H_2O_2 -stimulierte

Poly-ADP-Ribosylierung. Interessanterweise war in bestimmten Fällen der Exposition diese Konzentration für den Menschen nicht toxisch [80]. Dieselbe Gruppe behandelte daraufhin in Experimenten mit demselben Design menschliche Astrozyten und erhielt ein ähnliches Ergebnis, also eine effektive Störung der durch DNA-Schädigung induzierten Poly-ADP-Ribosylierung. Die Studie wurde auf primäre Endothelzellen aus Hirnkapillaren des Schweins ausgeweitet, wobei reaktive Sauerstoff- sowie Stickstoffspezies bei einer Konzentration $\geq 0,5 \mu M$ $MnCl_2$ als empfindlichste Endpunkte bestimmt wurden [81]. Die in [80] beschriebenen Ergebnisse stimmen in gewisser Weise mit einer Untersuchung an kultivierten humanen Lymphozyten überein, bei der die Behandlung mit Mn Klastogenität und DNA-Strangbrüche induzierte, obwohl die getestete Konzentration höher lag ($25 \mu M$). Alle eingesetzten Konzentrationen ($15, 20, 25 \mu M$) waren zytotoxisch und erniedrigten den mitotischen Index bei Behandlung in der G1-, G1/S- und S-Phase (1 und 6 h) signifikant. Chromosomenaberrationen wurden ausschließlich bei Behandlung in der G2-Phase des Zellzyklus gefunden. Die Autoren schlugen vor, dass Mn bei den getesteten Konzentrationen die Bildung der mitotischen Spindel nicht beeinträchtigt, da in der Mitose keine Polyploidie vorliegt [82]. Diese Untersuchungen wurden in humanen Lymphozyten durchgeführt, sollten aber in weiteren menschlichen Zellen wiederholt werden. Insbesondere sollten auch In-vivo-Modelle eingesetzt werden, um diese Befunde zu molekularen Effekten der Mn-Neurotoxizität zu bestätigen. Des Weiteren zeigten Bornhorst et al. an einer humanen Lungenzelllinie nach Behandlung mit $MnCl_2$ ($\geq 50 \mu M$) eine Abnahme der ATP-, NAD^+ - und NADH-Konzentration sowie des $NAD^+/NADH$ -Verhältnisses. Diese Nukleotide sind am Energiestoffwechsel und an der Regulation des Redoxstatus von Zellen beteiligt. Ein Ungleichgewicht führt daher zu oxidativem Stress infolge einer Störung der Mitochondrienfunktion, wie es auch bei den Mn-induzierten Effekten der Fall ist. Erstaunlicherweise waren kultivierte Astrozyten widerstandsfähiger gegen Mn [83]. Untersuchungen zur zellulären Neurotoxizität von Mn wurden auch von Hernández et al. durchgeführt [84]. Dabei wurden die toxischen Effekte von im Labor hergestellten und (durch Elektronenspinresonanz-Spektroskopie) bestätigten Mn-Spezies ($MnCl_2$, Mn(II)-Citrat, Mn(III)-Citrat und Mn(III)-Pyrophosphat) in Primärkulturen von neokortikalen (CTX-)Zellen und zerebellären Körnerzellen (CGC) getestet. Insgesamt waren CGC signifikant empfindlicher gegenüber Mn-induzierter Toxizität als CTX-Zellen. Alle getesteten Mn-Spezies störten die mitochondriale Homöostase, was die Hypothese stützte, dass Mitochondrien für den Mechanismus der Mn-induzierten Toxizität eine wichtige Rolle spielen. Der GSH-Spiegel wurde in keinem der beiden Zelltypen signifikant beeinflusst, obwohl ein Trend zu einem erhöhten GSH-Spiegel bei niedrigen und zu einem erniedrigten GSH-Spiegel bei hohen Mn-Konzentrationen zu beobachten war. Die Autoren wiesen darauf hin, dass die Mn-induzierte Neurotoxizität vom betroffenen Typ von Hirnzellen sowie von der angewendeten Mn-Spezies abhängt. Beim Versuch, die Toxizität von Mn auf molekularer Ebene zu untersuchen, sollten die vielfältigen Interaktionen verschiedener Faktoren und die sich daraus ergebende Wirkungssteigerung im Auge behalten werden. Es dürfte hilfreich sein, nicht nur das interessierende Molekül, sondern auch das umgebende

Milieu zu betrachten und zu bedenken, welche Moleküle an der Regulation des untersuchten Moleküls beteiligt sein könnten. Folglich ist es keine Überraschung, dass neben der direkten Toxizität von Mn in den Basalganglien auch Genmutationen eine entscheidende Rolle spielen [85]. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, dass zwei Gene, Parkin (eine Ubiquitin-E3-Ligase) und PARK9 (ein orthologes Gen des menschlichen Gens ATP13A2 aus Hefe), Zellen möglicherweise vor der Toxizität von Mn schützen könnten [62,86]. Erst vor kurzem wurde gezeigt, dass zwei getestete Polymorphismen von PARK9 bei älteren Menschen die Beeinträchtigung der motorischen Koordination infolge einer Mn-Exposition signifikant modifizierten, auch nach Korrektur um Alter und Geschlecht [87]. Kürzlich wurde über einen weiteren Mechanismus der zellulären Antwort auf Mn in GABAergen Neuronen berichtet, an dem das Golgi-Phosphoprotein 4 beteiligt ist. Die Ergebnisse zeigten des Weiteren, dass der Abbau von GPP130 im Gehirn von Mn-exponierten Ratten eine frühe und empfindliche zelluläre Antwort auch auf sehr niedrige Mn-Konzentrationen darstellt [88]. Eine frühe Studie aus dem Jahr 1987 ist erwähnenswert, da sie die genetischen Faktoren, die zu erhöhter Suszeptibilität für eine Mn-Intoxikation führen, herausstellt. In der Publikation wird über eine Gemeinschaft von Aborigines berichtet, die in einer Region lebte, in der unmittelbar unter der Erdoberfläche Mn-Erze vorkommen (Groote Eylandt, Nordaustralien). Die Aborigines sowie Angehörige anderer Ethnien arbeiteten zum Teil in einer örtlichen Manganmühle [89]. Eine beträchtliche Zahl dieser Aborigines wies eine erhöhte Mn-Konzentration im Blut und neurologische Anzeichen für zerebelläre und okulomotorische Symptome sowie Symptome des ersten Motoneurons auf. Weitere Untersuchungen ergaben, dass Personen, die generell anderen Ethnien angehörten, sowie diejenigen Aborigines, die keine umweltbedingten Beeinträchtigungen aufwiesen, einen signifikant niedrigeren Mn-Spiegel im Blut und weniger Symptome aufwiesen. Die Autoren zogen daher den Schluss, dass Aborigines anfälliger für eine Akkumulation von Mn sein könnten. Mit den heute verfügbaren modernen Methoden ist es möglich und unerlässlich, genetische und epigenetische Studien einzubeziehen, um die individuellen Manifestationen des Manganismus besser zu verstehen, die von den unterschiedlichen Bedingungen der Mn-Exposition sowie von Geschlecht, Alter und Umwelt abhängig sind.

Schwerpunkt Mn-Spezies

Eine Literaturübersicht zur Mn-Speziation im Hinblick auf Neurodegeneration und in Übereinstimmung mit den IUPAC-Definitionen der Speziation, die von Templeton et al. [90] publiziert wurden, ergab, dass die Mn-Speziation mit Blick auf neurodegenerative Effekte ab dem Jahr 2004 [91] hauptsächlich von unserer Gruppe durchgeführt wurde, was zu einer Reihe aufeinanderfolgender Publikationen führte, von denen die ersten im Jahr 2007 zusammengefasst wurden [9]. Das wichtigste Ergebnis dieser Arbeiten war, dass in menschlichem Serum vor allem Mn-Verbindungen mit hohem Molekulargewicht (HMM) vorkamen, die der α -2-Makroglobulin- und der Transferrin-/Albumin-Fraktion zuzurechnen sind, und nur wenige Mn-Spezies mit niedrigem

Molekulargewicht (LMM), während im Liquor hauptsächlich LMM gefunden wurden, wobei Mn-Citrat gegenüber einigen anderen überwog. Folglich wurde die Hypothese formuliert, dass Mn-Citrat nach einer Mn-Exposition eine äußerst wichtige Mn-Spezies darstellen könnte, die die neuronalen Barrieren ohne ausreichende Kontrolle passieren kann [9,92].

Seit 2007 wurden in verschiedenen Folgestudien zur Mn-Speziation die noch offenen Fragen im Zusammenhang mit Mn-Spezies untersucht. Folgende Fragen wurden untersucht:

- Wie hoch sind die Konzentrationen von Mn-Spezies an den neuronalen Barrieren, d. h. direkt davor (im Serum) und dahinter (im Liquor)?
- Gibt es Parallelen oder Verbindungen zu anderen Metallspezies, z. B. von Fe?
- Da Untersuchungen zur Speziation an nicht exponierten Personen durchgeführt worden waren: Welche Mn-Verbindungen können nach einer Exposition nachgewiesen werden? Um diese Frage zu beantworten, wurde bei Ratten, die einmalig einer geringen Mn-Dosis ausgesetzt worden waren, eine Mn-Speziation durchgeführt, um die Ergebnisse für menschliche Körperflüssigkeiten zu bestätigen.
- Gibt es beim Menschen Wechselbeziehungen zwischen Mn-Spezies im Serum und im Liquor?
- Sind diese Wechselbeziehungen abhängig von der Konzentration?
- Können deutliche Korrelationen gezeigt und für ein Mn-Biomonitoring genutzt werden?

Nischwitz et al. [57] befassten sich mit den Fragen (a) und (b): Diese Autoren untersuchten die Permeabilität der Blut-Liquor-Schranke für ausgewählte Metalle (Mn, Fe, Cu, Zn, Mg und Ca). Während der Speziationsanalyse war es ein Problem, die Stabilität der Mn-Spezies aufrechtzuerhalten. Daher wurde durchgehend die Methode der Größenausschlusschromatographie in Kombination mit Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) verwendet. Peakfraktionen in Serum und Liquor wurden quantifiziert, und die Liquor/Serum-Quotienten wurden berechnet. Das wichtigste Ergebnis dieser Studie war, dass hinsichtlich der molekularen Größenverteilung der Spezies der ausgewählten Metalle signifikante Unterschiede zwischen den Liquor- und den Serumproben auftraten. Es wurde angenommen, dass dies auf die selektive Permeabilität der BCB für Metallspezies aus dem Serum in den Liquor zurückzuführen war. Was Mn betraf, so war der Gradient vom Serum zum Liquor für alle Spezies negativ, außer für die Mn-Citrat-Fraktion, die signifikant angereichert war. Im Serum waren Fe, Cu und Zn hauptsächlich an HMM-Spezies gebunden, Mg und Ca dagegen an LMM-Spezies. Die Ergebnisse wiesen auf einen gut kontrollierten, Rezeptor-vermittelten Pfad für HMM-Spezies an der neuronalen Barriere hin, jedoch auf eine weniger selektive Kontrolle für LMM-Spezies. Dies wurde für den Fall einer hohen Konzentration von LMM-Metallspezies im Serum nach übermäßiger Exposition gegenüber Mn als Risiko angesehen.

Die Ergebnisse von Nischwitz et al. [57] standen im Einklang mit den Daten von Yokel [3], der gefunden hatte, dass Mn-Citrat eine weitere im Plasma vorhandene Mn-Spezies darstellt, die möglicherweise ins Gehirn aufgenommen wird.

Darüber hinaus überstieg der K_{in} von Mn-Citrat den für die Diffusion in sechs Gehirnregionen, einschließlich des Nucleus caudatus, erwarteten Wert [93]. Der Nucleus caudatus ist Teil der Basalganglien, die bei Manganismus betroffen sind und in denen sich bei dieser Störung Mn ansammelt. Die Ergebnisse wiesen also auf eine zur Akkumulation von Mn beitragende, Carrier-vermittelte Aufnahme von Mn-Citrat hin. Mit einer so hohen Aufnahme rate ist der Influx von Mn-Citrat ins Gehirn vergleichbar mit dem Influx des Mn^{2+} -Ions, was nahelegt, dass Mn-Citrat eine der wichtigsten Spezies ist, die ins Gehirn gelangen [57]. Da die Speziationsergebnisse von Nischwitz et al. [57] von Körperflüssigkeiten nicht exponierter menschlicher Probanden stammten, untersuchten Diederich et al. [94] Mn-Spezies in Serum- und Gehirnproben von Ratten nach einer genau definierten Exposition. Sie befassten sich somit mit Frage (c).

Diese Untersuchungen sollten das Verständnis des komplexen Metabolismus von Mn-Spezies in vivo verbessern. Die Ergebnisse belegten die Hypothese einer Bildung von LMM-Mn-Spezies in vivo. Die Aufnahme von anorganischem Mn, die mit einer einzelnen i.v. Injektion simuliert wurde, führte zu einer Überladung der ursprünglichen Carrier für HMM-Mn und zur Bildung von LMM-Mn-Spezies im Serum Mn-exponierter Ratten, wobei Mn-Citrat als Ko-Eluent der Hauptfraktion niedermolekularer Mn-Spezies beobachtet wurde. Dies stand im Einklang mit den Daten von Yokel und Crossgrove [8], die zuvor bereits für Mn-Citrat und anorganisches Mn höhere Influx-Koeffizienten aus dem Blut ins Gehirn gefunden hatten als für natives Mn-Transferrin. Die signifikant höhere Mn-Gesamtkonzentration im Gehirn und in der Niere Mn-exponierter Ratten ging auf die deutlich erhöhte Konzentration von Mn-Citrat und anorganischem Mn zurück. Daher schienen der unkontrollierte Transport und die letztendliche Akkumulation von LMM-Mn-Spezies im Gehirn und in der Niere der schädigende Pfad des Mn-Metabolismus nach Exposition zu sein. Die Muster der Mn-Spezies im Gehirn und in der Niere waren ähnlich. Die Autoren folgerten daraus, dass die Bestimmung spezifischer LMM-Mn-Spezies (Mn-Citrat) im Serum als Biomarker für eine subchronische Mn-Exposition in vivo von Nutzen sein könnte [94].

Im Hinblick auf die Fragen (d) bis (f) wurde eine Folgestudie durchgeführt, in der an individuellen gepaarten Proben mögliche Zusammenhänge zwischen Mn-Spezies im Serum oder Plasma einerseits und im Liquor andererseits untersucht wurden [95]. Zur Qualitätskontrolle sowie zur Identifikation von Spezies wurden zwei 2D-Ansätze verfolgt: Zunächst erfolgte Trennung durch SEC, dann entweder durch Kapillarelektrophorese-ICP-MS mit dynamischer Reaktionszelle oder durch Elektrospray-Ionisations-Fouriertransformations-Zyklotron-MS (ESI-FT-ICR-MS). Schließlich wurden die Konzentrationen der Mn-Spezies aus den verschiedenen Probentypen zueinander in Beziehung gesetzt und die Korrelationskoeffizienten wurden berechnet.

In dieser Studie konnte in einer nativen Probe bei einer Mn-Konzentration von $1 \mu\text{g/l}$ und im neutralen pH-Bereich der relevante $[\text{Mn}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2]^{4-}$ -Komplex als vorherrschende Mn-Citrat-Spezies nachgewiesen werden. In einer früheren Arbeit war über eine Nachweisgrenze für Mn-Citrat von $250 \mu\text{g/l}$ bei der Bestimmung mittels ESI-MS/MS berichtet worden [96]. Auf der Grundlage der Korrelationsberechnung wurde eine „Switch-Konzentration“ für das Gesamt-Mn im

Serum ermittelt, bei der sich der Zusammenhang zwischen Mn-Spezies im Serum und im Liquor änderte: Bei einer Mn-Gesamtkonzentration unter $1,55 \mu\text{g/l}$ im Serum korrelierten proteingebundene Mn-Spezies wie Mn-Transferrin/-Albumin mit der Mn-Gesamtkonzentration im Serum und im Liquor, während oberhalb dieser „Switch-Konzentration“ die Mn-Gesamtkonzentration sowohl im Serum als auch im Liquor mit der Konzentration von Mn-Citrat im Serum korrelierte.

Die statistische Analyse unterstrich die obigen Befunde. Dies führte zu der Annahme, dass eine erhöhte Konzentration von Mn-Citrat im Serum oder Plasma ein geeigneter Marker für eine erhöhte Mn-Gesamtkonzentration im Liquor (und im Gehirn) sein könnte, d. h. ein Biomarker für ein erhöhtes Risiko Mn-abhängiger neurologischer Störungen wie Manganismus aufgrund berufsbedingter Mn-Exposition.

Neuartiges Mn-Biomonitoring beim Menschen

Es sollte betont werden, dass die Symptome einer Mn-Intoxikation, sobald sie sich bemerkbar machen, in der Regel progredient und irreversibel sind und bis zu einem gewissen Grad die dauerhafte Schädigung neuronaler Strukturen widerspiegeln. Daher ist die Suche nach einem zuverlässigen biologischen Indikator oder Biomarker für eine frühe Mn-Exposition zu einem wichtigen Forschungsziel bei den klinischen Untersuchungen zur Neurotoxizität des Mn in der Arbeitsmedizin geworden [7].

Ein sinnvoller Indikator einer Mn-Exposition sollte im Idealfall folgende Bedingungen erfüllen: mit der Dosis der externen Exposition in Beziehung stehende Änderung und starke, schrittweise prozentuale Erhöhung zwischen den Vergleichsgruppen einer Studie [95].

Eine Messung der externen Exposition ist jedoch in der Regel am Arbeitsplatz nicht möglich, weshalb der Grad der Exposition gegenüber Mn unbekannt ist. Die Werte für Mn im Blut oder Urin stehen in einem komplexen und nur unzureichend verstandenen Zusammenhang mit den Werten für die externe Exposition und sind zur Bestimmung der internen Exposition nur von geringem Nutzen, insbesondere da die Exkretion primär über die Galle in den Fäzes erfolgt ($> 95\%$) [97]. Trotzdem ist die Mn-Konzentration im Plasma und Serum als Indikator bei der Beurteilung der Mn-Exposition intensiv erforscht worden, jedoch nur mit geringem Erfolg. Eine Studie von Smith et al. [97] zeigte, dass die Verwendbarkeit von Mn im Blut als Biomarker für die Exposition begrenzt ist und stark von den Expositionsparametern abhängt. Sie nahmen an, dass Mn (ähnlich wie Ca) während der Exposition im Knochen gespeichert und später, wenn die Exposition abnimmt oder aufhört, erneut ins Blut mobilisiert wird, so dass die Beurteilung einer früheren Mn-Akkumulation im Körper nicht möglich ist [7]. Daher kann der Mn-Serumspiegel allenfalls im Rahmen eines Gruppenvergleichs als geeigneter Indikator für eine kürzlich erfolgte Mn-Exposition dienen (z. B. Schweißer im Vergleich zu Kontrollpersonen). Jedoch kommt der Mn-Spiegel im Blut als Marker für klinische Zwecke nicht in Frage, da er durch die Ernährung oder andere Umweltfaktoren stark beeinflusst wird. In ihrer Pilotstudie verglichen Hoet et al. [98] Mn-Plasmawerte von Schweißern mit denen von Kontrollpersonen und fanden bei den Schweißern um 33% erhöhte Werte ($1,5$ vs. $2,0 \mu\text{g/l}$). Die Mn-Plasmakonzentration nach

der Schicht korrelierte mit der Mn-Exposition über die Luft, wenn die Konzentration in der Luft über $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ lag. Insbesondere am ersten Werktag der Woche wies ein Mn-Plasmawert von $2 \mu\text{g}/\text{l}$ mit einer Spezifität von 82% auf eine Exposition gegenüber mehr als $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ Mn hin. Die Autoren berichteten jedoch auch, dass an den folgenden Tagen trotz ähnlicher Exposition veränderte Zusammenhänge zwischen dem Mn in der Luft und dem Mn-Plasmawert bestanden: Am Dienstag war die Steigung der Regressionsgerade für die Verdopplung von $\log(\text{Mn-Luft})$ um den Faktor 2,3 niedriger als am Montag. Diese Befunde standen offensichtlich im Einklang mit der Schlussfolgerung von Smith et al. [97], dass der Mn-Serumspiegel allenfalls im Rahmen eines Gruppenvergleichs als geeigneter Indikator für eine kürzlich erfolgte Mn-Exposition dienen kann. Eine individuelle Beurteilung der Exposition dürfte jedoch wegen der starken Variation zwischen Einzelpersonen aufgrund von Unterschieden bei der Exkretion und der Verteilung in andere Gewebe problematisch sein. Des Weiteren werden Fe- und Mn-Serumproteine wie Ferritin oder Transferrin (Tf) oder die Anzahl der TfR-Rezeptoren als mögliche Biomarker in Betracht gezogen. Es wurde gezeigt, dass letzterer bei Schweißern, die berufsbedingt hohen Mn-Konzentrationen ausgesetzt waren, abnahm, während der Ferritin- und der Transferrin-Spiegel anstiegen [99]. Anders als andere neurotoxische Metalle, wie z. B. Hg und Pb, ist Mn ein essenzielles Element. Daher existieren vermutlich Homöostase-Mechanismen, die die Mn-Spiegel innerhalb eines schmalen Bereichs regulieren und eine direkte Beziehung zwischen externer Exposition und dem Gehalt im Körper verhindern.

Andere Matrices, die im Hinblick auf einen Nachweis von Mn untersucht wurden, sind Knochen, Haare und Nägel. Die erhaltenen Resultate waren jedoch einmal mehr inkonsistent und erlaubten die Unterscheidung zwischen exponierten und nicht exponierten Arbeitern nicht. Insbesondere Haare wurden in Studien zum Zusammenhang zwischen der Exposition und neuropsychologischen Effekten bei Kindern als Matrices für die Bestimmung von Mn und anderen Metallen verwendet [17,44,100]. Die ermittelten Konzentrationen waren jedoch ~ 4 - bis 70-mal höher als die bei einer Studie von Eastman et al. ermittelten [101], für die ein mehrstufiges Verfahren zur Reinigung der Haare vor der Bestimmung von Mn (und Pb, Cr, Cu) entwickelt worden war. Wenn Haare zur Bestimmung von Mn verwendet werden, ist deren Reinigung vor der Analyse unerlässlich. Trotzdem bleiben Haare eine unsichere Matrix für das Biomonitoring, da es äußerst schwierig ist, zwischen exogenem und metabolisch inkorporiertem Mn zu unterscheiden, insbesondere da die Konzentrationen nach einem gewissen Zeitraum wieder zu normalen Werten zurückkehren [7].

Scans am lebenden Gehirn mithilfe des MRT sind eine weitere vielversprechende Methode, die möglicherweise zur Diagnose von Mn-Neurotoxizität und Mn-Überexpression verwendet werden kann [4,7]. In einer Querschnittstudie untersuchten Jiang et al. [102] 18 Mn-exponierte Beschäftigte, von denen 13 hoch exponierte Schmelzer (Bereich der Exposition $0,31$ - $2,93 \text{ mg}/\text{m}^3$), 5 Mitarbeiter der Stromversorgungsabteilung derselben Fabrik (Bereich $0,23$ - $0,77 \text{ mg}/\text{m}^3$) und 9 Büroangestellte einer anderen Firma waren, die als Kontrollpersonen dienten (Bereich 0 - $0,01 \text{ mg}/\text{m}^3$). Die MRT-Daten zeigten einen durchschnittlichen Anstieg des Pallidum-Index (PI) von 7,4% ($p < 0,05$) und 16,1% ($p < 0,01$)

in der Gruppe der Arbeiter mit niedriger ($n = 5$) bzw. hoher ($n = 18$) Exposition, jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe. Klinische Symptome und Anzeichen von Manganismus wurden allerdings nicht beobachtet. Darüber hinaus wiesen 14 der 18 Mn-exponierte Mitarbeiter (78%) erhöhte PI-Werte auf, wobei der Anteil unter den stark exponierten Arbeitern noch höher war (85%). Der Mn-Spiegel im Vollblut, im Plasma und in den Erythrozyten wurde ebenfalls bestimmt. Bei den exponierten Arbeitern zeigten die PI-Werte eine signifikante (positive) Korrelation mit dem Mn-Gehalt der Erythrozyten. Die Autoren folgerten, dass T1-gewichtete MRT-Scans ein geeigneter Indikator für eine kürzliche Exposition von aktiven Beschäftigten gegenüber Mn in der Luft sein könnten, jedoch wahrscheinlich nicht sensitiv genug für Patienten sind, die aus dem belasteten Bereich entfernt worden sind. Darüber hinaus schlugen die Autoren vor, dass Erythrozyten nützlicher für das Mn-Biomonitoring sein könnten als Plasma oder Serum, da die Mn-Transporter TfR und DMT1 in Erythrozyten nachgewiesen wurden.

Trotzdem bildet der MRT-Ansatz allein keine anwendbare Methode für ein aussagekräftiges Biomonitoring beim Menschen (HBM).

Daher nahmen Cowan et al. eine intensive Evaluation von Matrices für ein Mn-Biomonitoring vor [103]. Diese Autoren befassten sich in einer Querschnittstudie mit Folgendem: (a) Bestimmung der Konzentration von Mn, Fe und Fe-metabolisierenden Proteinen in Speichel, Plasma, Erythrozyten, Urin und Haaren bei Mn-exponierten Schmelzern im Vergleich zu nicht exponierten Kontrollpersonen; (b) Beurteilung der Assoziation zwischen der Mn-Konzentration in der Luft und möglichen Biomarkern; (c) Festlegung eines Werts für einen zuverlässigen Biomarker, anhand dessen genau zwischen Mn-exponierten Personen und der nicht Mn-exponierten gesunden Bevölkerung unterschieden werden kann. Die Autoren berichteten im Ergebnisabschnitt ihrer Publikation, dass Speichel-, Plasma- und Erythrozytenproben eine signifikante, mit der Expositionsgruppe in Zusammenhang stehende Erhöhung der Mn-Konzentrationen aufwiesen, verglichen mit den Durchschnittswerten der Kontroll-, niedrig und hoch exponierten Gruppe. Außerdem beobachteten sie, dass die Mn-Konzentration im Speichel schwach, aber signifikant mit den Berufsjahren und dem Alter korrelierte.

Die Fe-Konzentration in Speichel- und Haarproben war beim Vergleich der Expositionsgruppen mit der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Andererseits war die Fe-Konzentration in Plasma und Erythrozyten signifikant niedriger, wobei sich die Ferritin-Konzentration sowohl im Serum als auch im Speichel bei den verschiedenen Gruppen nicht signifikant unterschied. Der Tf-Spiegel im Serum war bei den Mn-exponierten Schmelzern im Vergleich zu den Kontrollpersonen um 19-26% ($p < 0,05$) erhöht.

Am Ende waren mehr als 15 biologische Parameter aus fünf wichtigen biologischen Matrices untersucht worden. Im Diskussionsabschnitt ihrer Publikation folgerten die Autoren überraschenderweise, dass „keiner dieser Parameter mit den Berufsjahren oder dem Alter der Arbeiter assoziiert war“, obwohl die Arbeiter anhand des Mn/Fe-Quotienten (MIR) von den Kontrollen unterschieden werden konnten. Diese Schlussfolgerung scheint im Gegensatz zu den oben erwähnten Ergebnissen (signifikante Assoziation) zu stehen und lässt den Leser in diesem Punkt verwirrt zurück.

Der MIR für Erythrozyten und Plasma war bei Schmelzern im Vergleich zu den Kontrollpersonen signifikant ($p < 0,05$) erhöht. Der MIR im Speichel war bei der stark exponierten Gruppe, nicht aber bei der schwach exponierten Gruppe signifikant erhöht. Insgesamt korrelierten der MIR in Erythrozyten und der im Plasma stark mit der Mn-Konzentration in der Luft, und deren Unterschiede wurden durch Alter, Geschlecht, Einkommen oder Berufsjahre nicht signifikant beeinflusst. Im Jahr 2009 berichteten Cowan et al. [104], dass der MIR im Blut stärker mit der Mn-Konzentration in der Luft korrelierte. Jedoch können Krankheiten wie Anämie, die nicht mit der Exposition in Beziehung stehen, diesen möglichen Biomarker stark beeinflussen und seinen prädiktiven Wert einschränken.

Schließlich hat unsere Gruppe im Rahmen der Entwicklung einer HBM-Strategie kürzlich eine Korrelation zwischen Mn-Spezies im Serum und der Mn-Konzentration im Liquor errechnet (siehe Abschnitt Mn-Speziation). Insbesondere das Ergebnis, dass selbst eine leicht erhöhte Mn-Gesamtkonzentration im Serum oder Plasma auf über $1,6 \mu\text{g/l}$ mit der erhöhten Mn-Citrat-Konzentration und dass darüber hinaus diese erhöhte Mn-Citrat-Konzentration mit dem Mn-Gesamtgehalt im Liquor korrelierte, führte zu dem Schluss, dass diese Zusammenhänge für ein Mn-Biomonitoring beim Menschen eingesetzt werden könnten, mit der Verwendung der Mn-Citrat-Konzentration im Serum/Plasma als Mn-Biomarker [95]. Wir schlugen daher ein HBM-Konzept vor, das auf einem leicht erhöhten Mn-Gesamtgehalt und einer erhöhten Mn-Citrat-Konzentration im Serum/Plasma beruht. Dieses Konzept ist in Abb. 1 dargestellt.

Da das angewandte analytische Verfahren in der Regel für die Routineanwendung in arbeitsmedizinischen Labors nicht verfügbar ist, wurde getestet, ob Ultrafiltrations-(UF-)Einheiten mit einem Cutoff-Wert für das Molekulargewicht von 10 kDa eine geeignete Größenfraktionierung von Element-Spezies, insbesondere von Mn-, Fe-, Cu-, Zn-, Mg- und Ca-Spezies, in gepaarten menschlichen Liquor- und Serumproben liefern. Die UF-Einheiten enthielten jedoch beträchtliche Mengen an Zn, Cu und Ca und eine erhebliche Menge an Mn (im Verhältnis zu der in den Proben), was eine Reinigung vor der Verarbeitung von Proben erforderte. Am Ende ermöglichte ein siebenstufiges Reinigungsverfahren eine verlässliche Vorreinigung der UF-Einheit und die Ultrafiltration von Liquor- oder Serumproben innerhalb von 90 Minuten. Auf diese Weise war der Probendurchsatz höher und der Test war kostengünstiger als mithilfe der SEC-ICP-MS. Dies wurde als vorteilhaft erachtet, da die hohe Citratkonzentration im Liquor und im Serum leicht Metalle aus dem HPLC-System oder der SEC-Säule mobilisiert.

Insgesamt scheint die UF eine zuverlässige Methode der Größenfraktionierung von Metallspezies in gepaarten Liquor- und Serumproben zu sein, die neue Möglichkeiten für zukünftige Forschungsarbeiten in der Metall-Neurowissenschaft und für die Routineanwendung in arbeitsmedizinischen Labors eröffnet [105].

Zukünftiger Bedarf

So vielfältig wie die verschiedenen Richtungen, in die die Mn-Forschung steuert, ist auch der zukünftige Forschungsbedarf.

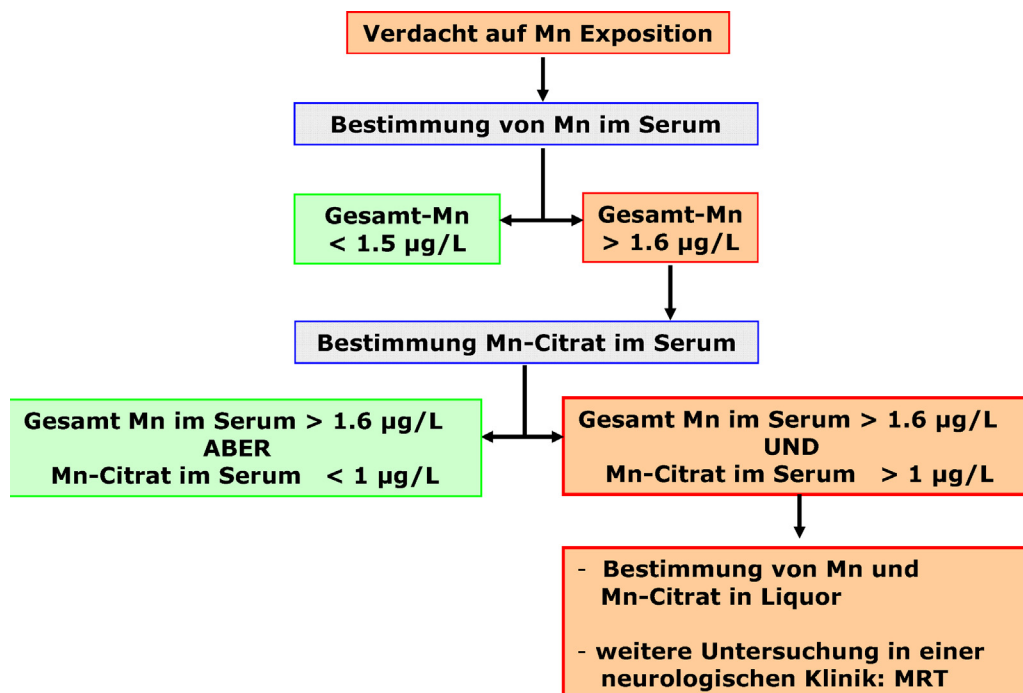


Abbildung 1 Flussdiagramm: Bestimmung von Mn-Citrat im Serum oder Plasma im Rahmen eines Mn-Biomonitoring. Bei Verdacht auf eine Mn-Exposition ist zunächst die Bestimmung der Mn-Gesamtkonzentration im Plasma/Serum ratsam. Auch bei nur leicht erhöhtem Wert ($> 1,6 \mu\text{g/l}$) ist eine Bestimmung des Mn-Citratspiegels erforderlich. Wenn der Mn-Citratspiegel erhöht ist ($> 1 \mu\text{g/l}$), sollte die Konzentration von Mn und Mn-Citrat im Liquor bestimmt und der Patient sollte zwecks MRT-Untersuchung an eine neurologische Abteilung überwiesen werden.

Mit den heute verfügbaren modernen Methoden ist es möglich, die Toxizität von Mn auf einem differenzierteren Niveau zu untersuchen. So sind die Positronen-Emissionstomographie und die Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie leistungsfähige Techniken zum Nachweis von möglicherweise beteiligten Neurotransmittern wie Dopamin im lebenden Gehirn und zur Bestimmung ihres Wirkorts. Darüber hinaus erfordert die Aufklärung des sehr komplexen Phänomens der Neurotoxizität von Mn, Untersuchungen auf der DNA- und der genetischen Ebene, wobei diese Methoden nicht nur für Zellkulturproben, sondern auch für Proben von In-vivo-Modellen oder humane Proben eingesetzt werden müssen. Überlegungen zu den genetischen Einflüssen auf die Prävalenz der PK bei Mn-exponierten Personen gewinnen zunehmend an Bedeutung. Darüber hinaus sind jedoch Untersuchungen zu den Wechselwirkungen zwischen Metallionen nötig, da Schweißrauch und andere Expositionsquellen außer Mn weitere Metalle enthalten. Interaktionen zwischen Fe und Mn wurden bereits intensiv diskutiert, jedoch müssen weitere Metalle wie Cu, Zn oder Ca in die Überlegungen einbezogen werden. Es ist bekannt, dass ein komplexes Netzwerk existiert, in dem diese Elemente die biologische Funktion der jeweils anderen positiv oder negativ beeinflussen. Ungleichgewichte in Bezug auf Metallionen könnten zu der Schädigung der Neuronen beitragen, die primär durch eine Mn-Überexposition verursacht wurde. Was diese Metalle betrifft, ist die Rolle des Transports über den Riechnerv ins Gehirn ebenfalls von großem Interesse und sollte weiter untersucht werden.

Des Weiteren ist die Bestimmung von Mn-Spezies in verschiedenen menschlichen Körperflüssigkeiten wie Serum und Liquor eine leistungsfähige Methode im Rahmen eines Mn-Biomonitoring. Wenn die entsprechende Technik gut etabliert ist, handelt es sich im Vergleich zur MRT oder hochauflösenden Massenspektrometrie um eine praktikable und sogar kostengünstige Methode.

So kann mithilfe eines geeigneten Mn-Biomonitorings die Belastung des menschlichen Körpers durch hohe Mn-Konzentrationen frühzeitig nachgewiesen werden, was die Prävention des Manganismus oder des durch langfristige Mn-Exposition induzierten Parkinsonismus durch möglichst weitgehenden Schutz der Neuronen gegen Mn (wie für Silymarin diskutiert) erleichtert.

Andererseits sollten Informationen über spezifische Mn-Spezies weiter dazu benutzt werden, Fragen zur Wechselbeziehung zwischen den Spezies und den molekularen Mechanismen der Mn-induzierten Toxizität in Neuronen zu klären: Gibt es Wechselbeziehungen oder sogar eine deutliche Korrelation zwischen bestimmten Mn-Spezies im Gehirn und Konzentrationsänderungen oder sonstigen Einflüssen auf Neurotransmitter oder die Aktivität der Acetylcholinesterase? Gibt es eine Korrelation zwischen einer bestimmten Mn-Spezies und Ungleichgewichten anderer Metallspezies, insbesondere Störungen des Fe(II)/Fe(III)-Gleichgewichts, die zu oxidativem Stress führen könnten? Schließlich: Welche anderen Stoffwechselwege werden durch spezifische Mn-Spezies beeinflusst? Vorläufige Experimente unseres Labors mittels ESI-FT-ICR-MS weisen darauf hin, dass im Gehirn eine enorme Zahl an Metaboliten und Stoffwechselwegen durch Mn beeinflusst wird und dass in der Zukunft Rückschlüsse

auf den Zusammenhang mit bestimmten Mn-Spezies gezogen werden können.

Offenlegung von Interessenkonflikten

Bei keinem der Autoren besteht ein Interessenkonflikt.

Danksagung

Dieser Review ist Teil der Serie von Übersichtsartikeln über Spurenelemente in dieser Zeitschrift, die von der Gesellschaft für Mineralstoffe und Spurenelemente e. V. initiiert wurde.

Literatur

- [1] Dobson AW, Weber S, Dorman DC, Lash LK, Erikson KM, Aschner M. Oxidative stress is induced in the rat brain following repeated inhalation exposure to manganese sulfate. *Biol Trace Elem Res* 2003;93(1–3):113–26.
- [2] Flynn MR, Susi P. Neurological risks associated with manganese exposure from welding operations – a literature review. *Int J Hyg Environ Health* 2009;212(5):459–69.
- [3] Yokel RA. Manganese flux across the blood–brain barrier. *Neurotoxicol Med* 2009;11(4):297–310.
- [4] Lucchini RG, Martin CJ, Doney BC. From manganism to manganese-induced parkinsonism: a conceptual model based on the evolution of exposure. *Neurotoxicol Med* 2009;11(4):311–21.
- [5] Aschner JL, Aschner M. Nutritional aspects of manganese homeostasis. *Mol Aspects Med* 2005;26(4–5):353–62.
- [6] Aschner M, Erikson KM, Hernandez EH, Tjalkens R. Manganese and its role in Parkinson's disease: from transport to neuropathology. *Neurotoxicol Med* 2009;11(4):252–66.
- [7] Aschner M, Guilarte TR, Schneider JS, Zheng W. Manganese: recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;221(2):131–47.
- [8] Yokel RA, Crossgrove JS. Manganese toxicokinetics at the blood–brain barrier. *Res Rep Health Eff Inst* 2004;119(7–58.) [discussion 59–73].
- [9] Michalke B, Halbach S, Nischwitz V. Speciation and toxicological relevance of manganese in humans. *J Environ Monit* 2007;9(7):650.
- [10] Crossgrove J, Zheng W. Manganese toxicity upon overexposure. *NMR Biomed* 2004;17(8):544–53.
- [11] Post JE. Manganese oxide minerals: crystal structures and economic and environmental significance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(7):3447–54.
- [12] EPA. Manganese (CASRN 7439-96-5) <http://www.epa.gov/iris/subst/0373.htm>. [26.08.13]. Integrated Risk Information System.
- [13] Environmental Protection Agency C, OH, US. Health assessment document for manganese: final report. 1984.
- [14] Meranger JC, Smith DC. The heavy metal content of a typical Canadian diet. *Can J Public Health Revue Canadienne de Sante Publique* 1972;63(1):53–7.
- [15] Kondakis XG, Makris N, Leotsinidis M, Prinou M, Papapetropoulos T. Possible health effects of high manganese concentration in drinking water. *Arch Environ Health* 1989;44(3):175–8.
- [16] Woolf A, Wright R, Amarasingwardena C, Bellinger D. A child with chronic manganese exposure from drinking water. *Environ Health Perspect* 2002;110(6):613–6.
- [17] Bouchard M, Laforest F, Vandelac L, Bellinger D, Mergler D. Hair manganese and hyperactive behaviors: pilot study

- of school-age children exposed through tap water. *Environ Health Perspect* 2007;115(1):122–7.
- [18] Roychowdhury T, Tokunaga H, Ando M. Survey of arsenic and other heavy metals in food composites and drinking water and estimation of dietary intake by the villagers from an arsenic-affected area of West Bengal. *India Sci Total Environ* 2003;308(1–3):15–35.
- [19] Frisbie SH, Ortega R, Maynard DM, Sarkar B. The concentrations of arsenic and other toxic elements in Bangladesh's drinking water. *Environ Health Perspect* 2002;110(11):1147–53.
- [20] WHO. Guidelines for drinking-water quality. Vol. 2. Health criteria and other supporting information, 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 1996.
- [21] Dorman DC, Struve MF, James RA, McManus BE, Marshall MW, Wong BA. Influence of dietary manganese on the pharmacokinetics of inhaled manganese sulfate in male CD rats. *Toxicol Sci* 2001;60(2):242–51.
- [22] Dorman DC, Struve MF, Wong BA. Brain manganese concentrations in rats following manganese tetroxide inhalation are unaffected by dietary manganese intake. *Neurotoxicology* 2002;23(2):185–95.
- [23] Zoni S, Bonetti G, Lucchini R. Olfactory functions at the intersection between environmental exposure to manganese and Parkinsonism. *J Trace Elem Med Biol* 2012;26(2–3):179–82.
- [24] Wang JD, Huang CC, Hwang YH, Chiang JR, Lin JM, Chen JS. Manganese induced parkinsonism: an outbreak due to an unrepaired ventilation control system in a ferromanganese smelter. *Br J Ind Med* 1989;46(12):856–9.
- [25] Kenangil G, Ertan S, Sayilir I, Ozekmekci S. Progressive motor syndrome in a welder with pallidal T1 hyperintensity on MRI: a two-year follow-up. *Mov Disord* 2006;21(12):2197–200.
- [26] ACGIH®. TLVs® and BEIs®. ISBN: 978-1-882417-95-7; 2009.
- [27] Nong A, Teeguarden JG, Clewell 3rd HJ, Dorman DC, Andersen ME. Pharmacokinetic modeling of manganese in the rat IV: assessing factors that contribute to brain accumulation during inhalation exposure. *J Toxicol Environ Health Part A* 2008;71(7):413–26.
- [28] Frumkin H, Solomon G. Manganese in the U.S. gasoline supply. *Am J Ind Med* 1997;31(1):107–15.
- [29] Baldwin M, Mergler D, Larribe F, Belanger S, Tardif R, Bilodeau L, et al. Bioindicator and exposure data for a population based study of manganese. *Neurotoxicology* 1999;20(2-3):343–53.
- [30] Hudnell HK. Effects from environmental Mn exposures: a review of the evidence from non-occupational exposure studies. *Neurotoxicology* 1999;20(2-3):379–97.
- [31] Kaiser J. Manganese: a high-octane dispute. *Science* 2003;300(5621):926–8.
- [32] Sikk K, Taba P, Haldre S, Bergquist J, Nyholm D, Zjablov G, et al. Irreversible motor impairment in young addicts – ephedrone, manganism or both? *Acta Neurol Scand* 2007;115(6):385–9.
- [33] Ferraz HB, Bertolucci PH, Pereira JS, Lima JG, Andrade LA. Chronic exposure to the fungicide maneb may produce symptoms and signs of CNS manganese intoxication. *Neurology* 1988;38(4):550–3.
- [34] Lucchini R, Zimmerman N. Lifetime cumulative exposure as a threat for neurodegeneration: need for prevention strategies on a global scale. *Neurotoxicology* 2009;30(6):1144–8.
- [35] Stastny D, Vogel RS, Picciano MF. Manganese intake and serum manganese concentration of human milk-fed and formula-fed infants. *Am J Clin Nutr* 1984;39(6):872–8.
- [36] Zatta P, Lucchini R, van Rensburg SJ, Taylor A. The role of metals in neurodegenerative processes: aluminum, manganese, and zinc. *Brain Res Bull* 2003;62(1):15–28.
- [37] Lucchini RG, Albini E, Benedetti L, Borghesi S, Coccaglio R, Malara EC, et al. High prevalence of Parkinsonian disorders associated to manganese exposure in the vicinities of ferroalloy industries. *Am J Ind Med* 2007;50(11):788–800.
- [38] Racette BA, McGee-Minnich L, Moerlein SM, Mink JW, Videen TO, Perlmuter JS. Welding-related parkinsonism: clinical features, treatment, and patho-physiology. *Neurology* 2001;56(1):8–13.
- [39] Zacco A, Resola S, Lucchini R, Albini E, Zimmerman N, Guazzetti S, et al. Analysis of settled dust with X-ray fluorescence for exposure assessment of metals in the province of Brescia. *Italy J Environ Monit* 2009;11(9):1579–85.
- [40] Squitti R, Gorgone G, Panetta V, Lucchini R, Bucossi S, Albini E, et al. Implications of metal exposure and liver function in Parkinsonian patients resident in the vicinities of ferroalloy plants. *J Neural Transm* 2009;116(10):1281–7.
- [41] Finkelstein MM, Jerrett M. A study of the relationships between Parkinson's disease and markers of traffic-derived and environmental manganese air pollution in two Canadian cities. *Environ Res* 2007;104(3):420–32.
- [42] Lucchini RG, Guazzetti S, Zoni S, Donna F, Peter S, Zacco A, et al. Tremor, olfactory and motor changes in Italian adolescents exposed to historical ferro-manganese emission. *Neurotoxicology* 2012;33(4):687–96.
- [43] Lucchini RG, Zoni S, Guazzetti S, Bontempi E, Micheletti S, Broberg K, et al. Inverse association of intellectual function with very low blood lead but not with manganese exposure in Italian adolescents. *Environ Res* 2012;118:65–71.
- [44] Bouchard MF, Sauve S, Barbeau B, Legrand M, Brodeur ME, Bouffard T, et al. Intellectual impairment in school-age children exposed to manganese from drinking water. *Environ Health Perspect* 2011;119(1):138–43.
- [45] Zota AR, Ettinger AS, Bouchard M, Amarasiwardena CJ, Schwartz J, Hu H, et al. Maternal blood manganese levels and infant birth weight. *Epidemiology* 2009;20(3):367–73.
- [46] Roels HA, Bowler RM, Kim Y, Henn BC, Mergler D, Hoet P, et al. Manganese exposure and cognitive deficits: a growing concern for manganese neurotoxicity. *Neurotoxicology* 2012;33(4):872–80.
- [47] Ljung KS, Kippler MJ, Goessler W, Grander GM, Nermell BM, Vahter ME. Maternal and early life exposure to manganese in rural Bangladesh. *Environ Sci Technol* 2009;43(7):2595–601.
- [48] Barlow BK, Cory-Slechta DA, Richfield EK, Thiruchelvam M. The gestational environment and Parkinson's disease: evidence for neurodevelopmental origins of a neurodegenerative disorder. *Reprod Toxicol* 2007;23(3):457–70.
- [49] Henn BC, Schnaas L, Ettinger AS, Schwartz J, Lamadrid-Figueroa H, Hernandez-Avila M, et al. Associations of early childhood manganese and lead coexposure with neurodevelopment. *Environ Health Perspect* 2012;120(1):126–31.
- [50] Bouchard M, Mergler D, Baldwin M, Panisset M, Roels HA. Neuropsychiatric symptoms and past manganese exposure in a ferro-alloy plant. *Neurotoxicology* 2007;28(2):290–7.
- [51] Rohlman DS, Lucchini R, Anger WK, Bellinger DC, van Thriel C. Neurobehavioral testing in human risk assessment. *Neurotoxicology* 2008;29(3):556–67.
- [52] Couper J. Sur les effets du peroxide de manganese. *J Chim Méd Pharm Toxicol* 1837;3:223–5.
- [53] Weiss B. Economic implications of manganese neurotoxicity. *Neurotoxicology* 2006;27(3):362–8.
- [54] Josephs KA, Ahlskog JE, Klos KJ, Kumar N, Fealey RD, Trenerry MR, et al. Neurologic manifestations in welders with pallidal MRI T1 hyperintensity. *Neurology* 2005;64(12):2033–9.
- [55] Bornhorst J, Wehe CA, Huwel S, Karst U, Galla H-J, Schwerdtle T. Impact of manganese on and transfer across blood–brain and blood–cerebrospinal fluid barrier in vitro. *J Biol Chem* 2012;287(21):17140–51.
- [56] Bowman AB, Kwakye GF, Hernandez EH, Aschner M. Role of manganese in neurodegenerative diseases. *J Trace Elem Med Bio* 2011;25(4):191–203.
- [57] Nischwitz V, Berthele A, Michalke B. Speciation analysis of selected metals and determination of their total

- contents in paired serum and cerebrospinal fluid samples: an approach to investigate the permeability of the human blood–cerebrospinal fluid-barrier. *Anal Chim Acta* 2008;627(2):258–69.
- [58] Au C, Benedetto A, Aschner M. Manganese transport in eukaryotes: the role of DMT1. *Neurotoxicology* 2008;29(4):569–76.
- [59] Wang X, Li GJ, Zheng W. Upregulation of DMT1 expression in choroidal epithelia of the blood–CSF barrier following manganese exposure in vitro. *Brain Res* 2006;1097(1):1–10.
- [60] Crossgrove JS, Yokel RA. Manganese distribution across the blood–brain barrier III. The divalent metal transporter-1 is not the major mechanism mediating brain manganese uptake. *Neurotoxicology* 2004;25(3):451–60.
- [61] Wang X, Miller DS, Zheng W. Intracellular localization and subsequent redistribution of metal transporters in a rat choroid plexus model following exposure to manganese or iron. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008;230(2):167–74.
- [62] Gitler AD, Chesi A, Geddie ML, Strathearn KE, Hamamichi S, Hill KJ, et al. Alpha-synuclein is part of a diverse and highly conserved interaction network that includes PARK9 and manganese toxicity. *Nat Genet* 2009;41(3):308–15.
- [63] Jursa T, Smith DR. Ceruloplasmin alters the tissue disposition and neurotoxicity of manganese, but not its loading onto transferrin. *Toxicol Sci* 2009;107(1):182–93.
- [64] Stallings WC, Metzger AL, Patridge KA, Fee JA, Ludwig ML. Structure–function relationships in iron and manganese superoxide dismutases. *Free Radic Res Commun* 1991;1:2–3(Pt 1):259–68.
- [65] Chtourou Y, Trabelsi K, Fetoui H, Mkannez G, Kallel H, Zeghal N. Manganese induces oxidative stress, redox state imbalance and disrupts membrane bound ATPases on murine neuroblastoma cells in vitro: protective role of silymarin. *Neurochem Res* 2011;36(8):1546–57.
- [66] Santos D, Milatovic D, Andrade V, Batoreu MC, Aschner M, Marreilha dos Santos AP. The inhibitory effect of manganese on acetylcholinesterase activity enhances oxidative stress and neuroinflammation in the rat brain. *Toxicology* 2012;292(2–3):90–8.
- [67] Milatovic D, Gupta RC, Yu YC, Zaja-Milatovic S, Aschner M. Protective effects of antioxidants and anti-inflammatory agents against manganese-induced oxidative damage and neuronal injury. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011;256(3):219–26.
- [68] Liapi C, Zarros A, Galanopoulou P, Theocharis S, Skandali N, Al-Humadi H, et al. Effects of short-term exposure to manganese on the adult rat brain antioxidant status and the activities of acetylcholinesterase, (Na, K)-ATPase and Mg-ATPase: modulation by l-cysteine. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;103(2):171–5.
- [69] Lebda MA, El-Neweshy MS, El-Sayed YS. Neurohepatic toxicity of sub-acute manganese chloride exposure and potential chemoprotective effects of lycopene. *Neurotoxicology* 2012;33(1):98–104.
- [70] Lai JC, Leung TK, Lim L. Differences in the neurotoxic effects of manganese during development and aging: some observations on brain regional neurotransmitter and non-neurotransmitter metabolism in a developmental rat model of chronic manganese encephalopathy. *Neurotoxicology* 1984;5(1):37–47.
- [71] Martinez H, Bonilla E. Water intake and brain choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities in manganese treated rats. *Neurobehav Toxicol Teratol* 1981;3(3):277–80.
- [72] Fitsanakis VA, Au C, Erikson KM, Aschner M. The effects of manganese on glutamate, dopamine and gamma-aminobutyric acid regulation. *Neurochem Int* 2006;48(6–7):426–33.
- [73] Anderson JG, Cooney PT, Erikson KM. Brain manganese accumulation is inversely related to gamma-amino butyric acid uptake in male and female rats. *Toxicol Sci* 2007;95(1):188–95.
- [74] Anderson JG, Fordahl SC, Cooney PT, Weaver TL, Colyer CL, Erikson KM. Manganese exposure alters extracellular GABA, GABA receptor and transporter protein and mRNA levels in the developing rat brain. *Neurotoxicology* 2008;29(6):1044–53.
- [75] Crooks DR, Welch N, Smith DR. Low-level manganese exposure alters glutamate metabolism in GABAergic AF5 cells. *Neurotoxicology* 2007;28(3):548–54.
- [76] Santos D, Batoreu MC, Almeida I, Ramos R, Sidoryk-Wegrzynowicz M, Aschner M, et al. Manganese alters rat brain amino acids levels. *Biol Trace Elem Res* 2012;150(1–3):337–41.
- [77] Chen MK, Lee JS, McGlothlan JL, Furukawa E, Adams RJ, Alexander M, et al. Acute manganese administration alters dopamine transporter levels in the non-human primate striatum. *Neurotoxicology* 2006;27(2):229–36.
- [78] Guilarte TR, Chen MK, McGlothlan JL, Verina T, Wong DF, Zhou Y, et al. Nigrostriatal dopamine system dysfunction and subtle motor deficits in manganese-exposed non-human primates. *Exp Neurol* 2006;202(2):381–90.
- [79] Zhao F, Cai T, Liu M, Zheng G, Luo W, Chen J. Manganese induces dopaminergic neurodegeneration via microglial activation in a rat model of manganism. *Toxicol Sci* 2008;107(1):156–64.
- [80] Bornhorst J, Ebert F, Hartwig A, Michalke B, Schwerdtle T. Manganese inhibits poly(ADP-ribosyl)ation in human cells: a possible mechanism behind manganese-induced toxicity? *J Environ Monit* 2010;12(11):2062.
- [81] Bornhorst J, Meyer S, Weber T, Boker C, Marschall T, Mangerich A, et al. Molecular mechanisms of Mn induced neurotoxicity: RONS generation, genotoxicity, and DNA-damage response. *Mol Nutr Food Res* 2013;57(7):1255–69.
- [82] Lima PD, Vasconcellos MC, Bahia MO, Montenegro RC, Pessoa CO, Costa-Lotuf LV, et al. Genotoxic and cytotoxic effects of manganese chloride in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle. *Toxicol In Vitro* 2008;22(4):1032–7.
- [83] Bornhorst J, Ebert F, Lohren H, Humpf HU, Karst U, Schwerdtle T. Effects of manganese and arsenic species on the level of energy related nucleotides in human cells. *Metallomics: Integr Biomol Sci* 2012;4(3):297–306.
- [84] Hernandez RB, Farina M, Esposito BP, Souza-Pinto NC, Barbosa Jr F, Sunol C. Mechanisms of manganese-induced neurotoxicity in primary neuronal cultures: the role of manganese speciation and cell type. *Toxicol Sci* 2011;124(2):414–23.
- [85] Roth JA. Are there common biochemical and molecular mechanisms controlling manganism and parkinsonism. *Neuromol Med* 2009;11(4):281–96.
- [86] Higashi Y, Asanuma M, Miyazaki I, Hattori N, Mizuno Y, Ogawa N. Parkin attenuates manganese-induced dopaminergic cell death. *J Neurochem* 2004;89(6):1490–7.
- [87] Rentschler G, Covolo L, Haddad AA, Lucchini RG, Zoni S, Broberg K. ATP13A2 (PARK9) polymorphisms influence the neurotoxic effects of manganese. *Neurotoxicology* 2012;33(4):697–702.
- [88] Masuda M, Braun-Sommargren M, Crooks D, Smith DR. Golgi phosphoprotein4 (GPP130) is a sensitive and selective cellular target of manganese exposure. *Synapse* 2012;67(5):205–15.
- [89] Cawte J, Hams G, Kilburn C. Manganism in a neurological ethnic complex in northern Australia. *Lancet* 1987;329(8544):1257.
- [90] Templeton DM, Ariese F, Cornelis R, Danielsson LG, Muntau H, Van Leeuwen HP, et al. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological

- approaches (IUPAC Recommendations 2000). *Pure Appl Chem* 2000;72(8):1453–70.
- [91] Michalke B. Manganese speciation using capillary electrophoresis – ICP-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2004;1050(1):69–76.
- [92] Michalke B, Berthele A, Mistriotis P, Ochsenkuhn-Petropoulou M, Halbach S. Manganese speciation in human cerebrospinal fluid using CZE coupled to inductively coupled plasma MS. *Electrophoresis* 2007;28(9):1380–6.
- [93] Crossgrove JS, Allen DD, Bukaveckas BL, Rhineheimer SS, Yokel RA. Manganese distribution across the blood–brain barrier. I. Evidence for carrier-mediated influx of manganese citrate as well as manganese and manganese transfer-in. *Neurotoxicology* 2003;24(1):3–13.
- [94] Diederich J, Brielmeier M, Schwerdtle T, Michalke B. Manganese and iron species in Sprague-Dawley rats exposed with MnCl₂ center dot 4H(2)O (i.v.). *Microchem J* 2012;105:115–23.
- [95] Michalke B, Lucio M, Berthele A, Kanawati B. Manganese speciation in paired serum and CSF samples using SEC-DRC-ICP-MS and CE-ICP-DRC-MS. *Anal Bioanal Chem* 2013;405(7):2301–9.
- [96] Nischwitz V, Michalke B. Electrospray ionisation with selected reaction monitoring for the determination of Mn-citrate, Fe-citrate. Cu-citrate and Zn-citrate *Rapid Commun Mass Spectrom* 2009;23(15):2338–46.
- [97] Smith D, Gwiazda R, Bowler R, Roels H, Park R, Taicher C, et al. Biomarkers of Mn exposure in humans. *Am J Ind Med* 2007;50(11):801–11.
- [98] Hoet P, Vanmarcke E, Geens T, Deumer G, Haufroid V, Roels HA. Manganese in plasma: a promising biomarker of exposure to Mn in welders. A pilot study. *Toxicol Lett* 2012;213(1):69–74.
- [99] Lu L, Zhang LL, Li GJ, Guo W, Liang W, Zheng W. Alteration of serum concentrations of manganese, iron, ferritin, and transferrin receptor following exposure to welding fumes among career welders. *Neurotoxicology* 2005;26(2):257–65.
- [100] Wright RO, Amarasiriwardena C, Woolf AD, Jim R, Bellinger DC. Neuropsychological correlates of hair arsenic, manganese, and cadmium levels in school-age children residing near a hazardous waste site. *Neurotoxicology* 2006;27(2):210–6.
- [101] Eastman R, Jursa T, Benedetti C, Lucchini R, Smith D. Hair as a biomarker of environmental manganese exposure. *Environ Sci Technol* 2012;47(3):1629–37.
- [102] Jiang YM, Zheng W, Long LL, Zhao WJ, Li XR, Mo XA, et al. Brain magnetic resonance imaging and manganese concentrations in red blood cells of smelting workers: search for biomarkers of manganese exposure. *Neurotoxicology* 2007;28(1):126–35.
- [103] Cowan DM, Fan QY, Zou Y, Shi XJ, Chen J, Aschner M, et al. Manganese exposure among smelting workers: blood manganese-iron ratio as a novel tool for manganese exposure assessment. *Biomarkers* 2009;14(1):3–16.
- [104] Cowan DM, Zheng W, Zou Y, Shi XJ, Chen J, Rosenthal FS, et al. Manganese exposure among smelting workers: relationship between blood manganese-iron ratio and early onset neurobehavioral alterations. *Neurotoxicology* 2009;30(6):1214–22.
- [105] Nischwitz V, Berthele A, Michalke B. Rapid size fractionation of metal species in paired human serum and cerebrospinal fluid samples using ultra-filtration with off-line element selective detection. *J Anal At Spectrom* 2010;25(7):1130–7.