

Szerves higanyvegyület szubkrónikus orális adagolásával kiváltott magasabb idegrendszeri változások vizsgálata patkány kísérletes modellben

HORVÁTH EDINA, VEZÉR TÜNDE

SZTE Általános Orvostudományi Kar Népegészségtani Intézet, Szeged

Összefoglalás: Az ember évezredek óta ismeri és használja a fémeket mindennapi tevékenysége során. Ugyanakkor számos irodalmi adat áll rendelkezésünkre például az élelmiszerláncon keresztül a szervezetbe jutó és ott kumulálódó toxikus nehézfémek (higany, ólom, kadmium stb.) egészségkárosító hatásairól. A fémek alkalmazása elkerülhetetlen, ezért a pathofiziológiás elváltozások mechanizmusának tanulmányozása és korai felismerése, továbbá az általuk kiváltott toxikus effektusok hatékony megelőzése, gyakorlati szempontból nélkülözhetetlen.

Jelen kísérletünkben fiatal felnőtt, hím Wistar patkányokat (n=12 patkány/csoport) kezeltünk gyomorszájban keresztül 0,50 mg/ttkg és 0,05 mg/ttkg metil-higany kloriddal (MeHg-Cl) 5 héten át. A kísérlet hatodik hetében az állatok magasabb rendű idegrendszeri változásait (spontán motoros aktivitás, pszichomotoros és szenzomotoros gátlás teljesítmény, rövid-távú munkamemória teljesítmény, motoros koordináció) vizsgáltuk komplex magatartás-toxicológiai módszerekkel. Az eredmények azt mutatják, hogy a kis MeHg-Cl dózissal kezelt állatok spontán lokomotoros aktivitása és a nagy dózissal kezelt állatok motoros koordinációja szignifikánsan csökkent. A szenzomotoros gátlás teljesítmények mindkét kezelt csoportban szignifikáns csökkenést mutattak. A kezelt állatok – kontroll csoporttal összevetett – pszichomotor, szenzomotor gátlás és lokomotor aktivitás-változása valószínűsíti a MeHg-Cl expozíció kiváltotta több kéreg alatti régió (bazális ganglion, kisagy) érintettségét. A szubkortikális központok kóros működését jelző, megváltozott funkcionális tevékenységek korai detektálására a kísérletben alkalmazott komplex vizsgálati módszer megfelelő érzékenységűnek bizonyult.

Kulcsszavak: metil-higany klorid, térbeli memória, spontán lokomotor aktivitás, motoros koordináció, szenzomotoros teljesítmény

Egészségtudomány 53/3, 20-33 (2009)

Közlésre érkezett: 2009. április 7-én

Elfogadva: 2009 május 4-én

HORVÁTH EDINA

6720 Szeged, Dóm tér 10.

tel.: + 62-545-119

fax: + 62-545-120

e-mail: horvath@puhe.szote.u-szeged.hu

Bevezetés

Régóta ismert, hogy a higany (Hg) különféle kémiai formáinak (elemi, szervetlen és szerves) magas koncentrációja toxikus hatást gyakorol a növényi, állati és emberi szervezetre. Egyes tanulmányok szerint évente mintegy 5000-7000 tonna higany kerül a Föld alsó légkörébe, melyből 3400-4500 tonna az emberi tevékenységekből származik (1, 2). Természetes eredetű Hg-szennyező forrás a vulkanizmus; az ásványi üledékekből, a természetes vizekből és a talajból történő gázkipárolgás; az erdőtüzek és a higany tartalmú talaj eróziója, melyek jelentős mértékben hozzájárulnak a környezetünk háttérszennyezettségéhez.

A természetes úton emittált higany – ellentétben az emberi tevékenységekből származó higany-szennyezéssel – nagy kiterjedésű földrajzi területeken detektálható, s egyenletes eloszlást mutat. A kommunális eredetű és a gyógyászati tevékenységből származó hulladék égetése; az (afrikai, dél-amerikai, ázsiai) aranykitermelés; a klór-alkáli ipar; a mezőgazdaságban használt egyes növényvédő- és gombaölő szerek; a papír-, festék-, cementipar; a szárazelemek, a kapcsolók, a mérőeszközök gyártása; a gyógyszer- és kozmetikai ipar; a széntüzelésű hőerőművek azok az antropogén eredetű higanyforrások, melyek hozzájárulnak egy „globális higanykészlet” létrehozásához (3, 4).

A korábbi kibocsátásokból származó higanykészlet folyamatosan változik, foto- és geokémiai reakciók során átalakul, lerakódik, és ismét mobilizálódik (5). Fontos megjegyezni, hogy az óceánok és a vízfolyások a higany kritikus lerakódási helyei. A leülepedést követően a higany gyorsan bekerül a táplálékláncba oly módon, hogy a vízben élő baktériumok felveszik és metil-higannyá (MeHg)

alakítják, mely az alacsonyabb rendű vízi szervezeteket fogyasztó kisebb-nagyobb ragadozó állatok (cápa, tonhal, kardhal) izomzatában egyre jobban felhalmozódik (6, 7).

A FAO és WHO Élelmiszer-adalékok Közös Szakértői Bizottsága (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA) 2003-ban 1,6 µg/ttkg ún. Időlegesen Elfogadható Heti Felvétel értéket (Provisional Tolerable Weekly Intake, PTWI) állapított meg a metil-higanyra vonatkozóan, melynek értelmében egy átlagos, 70 kg-os ember esetében – egészségkárosodás nélkül – hetente 112 µg MeHg bevitel „engedélyezett” (8). Néhány halfaj (cápa, kardhal) szervezete az egységnyi tömegről számított egy milliommód résznyi higanyt is tartalmazhat, így 200 grammnyi halhúsban akár 200 µg higany is előfordulhat (9, 10). A humán expozíció potenciális MeHg forrásai a kontaminált élelmiszerek (hal, kagyló, hal-készítmények, búza), melyeket az 1950-es években Japánban, és az 1970-es években Irakban történt „járványszerű” Hg intoxikációk igazoltak (11).

A táplálékkal bekerült MeHg 90%-a abszorbeálódik a gasztrointesztinális traktusból, majd átlépve a biológiai membrán barrieret (vékonybél mukóza, kapilláris-membrán, vér-agy gát, placenta) bejut a véráramba (12). A keringésbe jutott MeHg a központi idegrendszer egyes régióiban (agykéreg, hipokampusz, striátum, kisagy), a parenchymás szervekben (máj, vese), valamint a csontokban és az izmokban akkumulálódik (13). A MeHg elsősorban a központi idegrendszer (KIR) károsodását okozza. A Japánban és Irakban lezajlott, több ezer felnőttet és gyereket érintő drámai MeHg mérgezések érdemi információkat nyújtottak az expozícióval összefüggő kórkepek klinikai lefolyásáról.

A szubkrónikus MeHg mérgezések

során a felnőtt betegekben bevezető tünetként az ajkak, ujjak, karok paresztéziája, dizesztéziája jelentkezett, melyhez a betegség manifesztációját követően látótér beszűkülés, cerebelláris ataxia, izomgyengeség, dizarthria, tremor, továbbá mentális hanyatlás, a személyiség megváltozása és memóriazavar társult (11).

Szövettani vizsgálatok igazolták a MeHg okozta neuropathológiai változásokat, melyek szerint 12-20 $\mu\text{g/g}$ higany koncentráció strukturális károsodást okoz a kortex, bazális ganglionok, cerebellum és a diencephalon citoarchitektúrájában (14). A Japánban leírt mérgezések során végzett MRI vizsgálatok különböző mértékű atrófiát mutattak a cerebellumban és a kortex vizuális pre- és posztcentrális területén. A cerebellum post mortem szövettani vizsgálatai a granuláris és molekuláris rétegek vastagságának, és a Purkinje sejtek számának csökkenését mutatták, melyeken kívül a periférián neuronális degeneráció, demielinizáció jelei voltak megfigyelhetők [15].

A főtáris idegrendszer fokozott érzékenységét jelzi, hogy míg az exponált anya nem mutatta a MeHg mérgezés markáns neurológiai tüneteit, addig az újszülöttben súlyos cerebrális bénulások, süketség, vakság, mentális retardáció, a járás, a beszéd fejlődésének lassulása jelentkezett (16, 17). Ezen eredmények megerősítették azt a feltételezést, hogy a lipofil MeHg átjut a placentán, kiválasztódik az anyatejjel és károsítja a fejlődő idegrendszert.

A MeHg komplexeket képez a fehérjék tiol-csoportjával, így megváltoztatja a térszerkezetüket, s ezáltal a sejtek membrán-permeabilitását (18). Az intracelluláris penetrációt követően hatással van a neuronok bioelektromos tevékenységére, a szinaptikus transzmisszióra. A MeHg neurotoxikus hatása a sejszerkezetet károsító hatáson kívül a központi idegrendszer dopaminerg,

kolinerg, GABAerg, szerotoninerg, továbbá glutamáterg neurotransmitter rendszerekben történő gátló hatásával is magyarázható (20, 21, 22).

Saját vizsgálataink célja fiatal felnőtt Wistar patkányokban a szubkrónikus MeHg orális expozíció okozta funkcionális idegrendszeri változások korai detektálása volt, kellő érzékenységgel komplex magatartás-toxikológiai rendszer alkalmazásával. Azokat a relatíve alacsony dóziseket kerestük – a LOAEL (lowest observed adverse effect level) tartományokon belül –, amelyek a szubkrónikus per os adagolási séma mellett az idegrendszer magasabb szintű (tanulás, memória, koordináció) működésében változásokat okozhatnak.

A komplex magatartás-toxikológiai vizsgálatok során, az érintett területek funkcionális változásainak detektálásához, az állatok spontán készletés aktivitását, ijesztési reflex reakcióját, szenzomotoros gátlását, motoros koordinációját és rövidtávú memória teljesítményét mértük.

Anyag és módszer

Állatok és kezelés

A magatartás-kísérletekhez fiatal, felnőtt (10 hetes, 160 ± 20 g induló testtömegű) hím Wistar patkányokat használtunk, melyeket kontrollált állatházi körülmények között (12-12 órás fény-sötét ciklus, 22 ± 2 °C hőmérséklet, 60 ± 10 % páratartalom) tartottunk. A hét hétig tartó vizsgálati idő során a patkányok az ivóvízhez korlátlanul, a normál rágcsálótáphoz – a 6 hetes jutalom-stratégián alapuló térbeli memória tesztek alatt – azonban csak a vizsgálatot követően, naponta maximum 60 perces időtartamra férhettek hozzá. Az állatok két csoportját (12-12 patkány) a térbeli memória vizsgálat 8. napjától kezdődően, 5 héten át, heti 5 alkalommal kezeltük napraforgó olajban oldott, 0,05 mg/ttkg

illetve 0,50 mg/ttkg metil-higany klorid (MeHg-Cl) dózisokkal, míg a harmadik (kontroll) csoport (12 patkány) napraforgó olajat (1,0 ml/ttkg) kapott gyomorszondán keresztül. Az állatok testtömegét – a magatartás vizsgálatokat követően – naponta mértük.

Magatartás-toxicológiai vizsgálatok

Tanulás és rövid-távú térbeli memória vizsgálata 8-karú sugaras útvesztőben

A térbeli memória vizsgálatokat állandó berendezésű, kb. 30 lux megvilágítású szobában elhelyezett 8-karú sugaras útvesztőben (Columbus Instrument, USA) végeztük 6 héten át, melyre a szoktatás és a bevésés időszakában heti 6 napon át, a további fázisokban heti 5 napig 8.00 és 14.00 óra között került sor. A vizsgálat második hetétől dokumentáltuk a készülékbe helyezett állatok futása kezdetének és végének az idejét, a karokba futások sorrendjét (stratégiáját), a hibás válaszok számát, valamint a forgások irányát. A kapott adatokból továbbszámoltuk a futások időtartamát; az összes, a helyes és a hibás, válaszok számát; a naponkénti és hetenkénti, az egyéni, valamint dóziscsoport teljesítményt. A térbeli memória vizsgálat első – kezelés nélküli – hetének 6 napos szoktatási ideje alatt az állatokat többesével, majd egyesével – a csoportokat a növekvő kezelési dózisoknak megfelelő sorrendben –, napi 2 alkalommal 10-10 percig az útvesztőbe tettük, melynek centrális és oktagonális elrendezésű karjaiba előzőleg – egyenletesen elosztva – kisméretű jutalomfalatokat helyeztünk el. A szoktatás alatt fokozatosan csökkentettük az egyszerre készülékbe helyezett állatok számát és a „jutalom falat” mennyiségét úgy, hogy az utolsó napon már csak 1-1 falat került a karok legtávolabbi pontjába és az állatok is

egyesével lettek a készülékbe téve. A vizsgálat addig tartott, míg egy állat valamennyi kar legtávolabbi pontjába egyszer be nem futott. A karok végében megtalált és elfogyasztott ételdarabkákat az adott állat vizsgálata alatt nem pótoltuk, így a szoktatás végére valamennyi patkány megtanulta a „jutalom” elérésének „győzelmi-taktika” stratégiáját [23].

A memória vizsgálat második – a kezelés első – hetében végzett 6 napos bevésés során az állatoknak a napi egyszeri, maximum 10 perces vizsgálat alatt a készülék valamennyi karjának legtávolabbi pontjába kellett egy alkalommal befutniuk. A bevésés fázisában napi/heti, egyéni/csoport teljesítményeket számoltunk.

A magatartás vizsgálatok harmadik, továbbá ötödik és hatodik heteiben végeztük el a 2, 3 és 4 órás térbeli munkamemória teszteket. Ebben a fázisban az állatok napi két alkalommal futottak. A patkányoknak az első futtatást követő 2, 3, illetve 4 óra múlva annak a négy karnak a legtávolabbi pontjába kellett elfutni, melyekben az első futás során még nem jártak. A korábban már látogatott karba történő visszatérések hibának számítottak. Az állatok teljesítményét a korábbi hetihez hasonlóan számoltuk.

A magatartás vizsgálatok negyedik – a kezelés harmadik – hetében napi egyszer teszteltük a patkányok referencia memória teljesítményét. Ebben a fázisban az állatoknak csak abba a négy karba kellett egyszer befutniuk, amelyeket a korábbi vizsgálati fázisok során (bevésés, 2 órás munka memória) előnyben részesítettek, azaz elsőként látogattak meg.

Motoros koordináció vizsgálat rotarod készülékben

A patkányok motoros koordinációját egyenletesen gyorsuló, 2-10 rpm sebességű rotarod készülékkel (ROTA-ROD for rats

47700, Ugo Basile, Italy) teszteltük; ennek lényege, hogy az állatoknak egy vízszintes tengely körül egyenletesen gyorsulva forgó dob tetején – folyamatosan lépkedve, illetve futva – kellett fennmaradniuk. A szoktatást hat héten át, heti egy alkalommal (ugyanazon napokon) végeztük, a térbeli memória vizsgálatot követően. A hetedik héten, az 5 perces vizsgálati idő alatt a patkányok fennmaradási időtartamát és mozgásmintázatát regisztráltuk, valamint a motoros koordináció teljesítményét is kiszámoltuk.

Spontán lokomotoros aktivitás vizsgálat open field készülékben

A memória tesztekét követően, a vizsgálat hetedik hetének első napján – csupán egy alkalommal – 8.00 és 14.00 óra között a patkányok spontán készítés aktivitását mértük open field készülékben (open field box CONDUCTA, Experiment, Hungary). Az állatokat – akklimatizáció céljából – a kísérlet megkezdése előtt 20-30 perccel a kb. 30 lux megvilágítású teszthelyiségbe vittük, ahol egyesével helyeztük őket a műszer centrális részébe. Az open field készülékhez tartozó szoftver segítségével 10 percig regisztráltuk az állatok által megtett út hosszát, a helyváltoztató mozgással töltött időt, az elindulások, illetve nekiiramodások számát, a helyzetváltoztató mozgással töltött időt és időszakok számát, az ágaskodásra, illetve felegyenesedésre fordított időt, valamint e szakaszok számát, továbbá az aktív mozgás nélkül töltött időszakok számát és hosszát.

Pszichomotoros reakció és szenzorimotoros gátlás vizsgálata ijesztési reflex készülékben

Az akusztikus ijesztési reflex egy hirtelen, nagy intenzitású hangingerre adott, teljes testizomzat összehúzóddással járó

válaszreakció([24]).

A vizsgálat hetedik hetének első napján – egy alkalommal – a patkányok akusztikus ijesztési reflexét egy hangszigetelt, 16×28×18cm méretű plexidoboz alján elhelyezett piezoelektromos erőmérő (Responder X System, Columbus Instruments, USA) segítségével vizsgáltuk. Az állatokat közvetlenül a rotarod teszt után egyesével helyeztük be a reflexkészülékbe. A 10 perces akklimatizációt követően, tíz alkalommal egymás után, 15 sec-ként, 200 ms-ig tartó, 110 dB intenzitású, 5 kHz frekvenciájú hangingerrel váltottuk ki az ijesztési reflex reakciót (acoustic startle reaction; ASR). Azokat az izomkontrakciókat tekintettük „zaj-pozitív válasz”-nak, melyek az 50 g tömeg által kifejtett súlyerőnél nagyobb erőt hoztak létre. A szoftver a „zaj pozitív válaszok” latenciáját, csúcsamplitúdóját és a csúcsamplitúdó eléréséhez szükséges időt automatikusan regisztrálta. A hangingerlést követő 10 perces nyugalmi szakaszt követően a vizsgálatot megismételtük úgy, hogy az ijesztési reflexet kiváltó (fent leírt paraméterekkel rendelkező) fő akusztikus inger 200 ms-mal megelőzte egy 73 dB-es, 1 kHz-es, 500 ms-ig tartó, ún. figyelmeztető – pre-pulse gátlást kiváló – sípszó. Az így kiváltott zaj-pozitív reakciók jellemző paramétereit ismét dokumentáltuk. Az adatokból pre-pulse gátlás teljesítményt (pre-pulse inhibition; PPI %) számoltunk [25].

Statisztikai értékelés

Az eredmények statisztikai értékelése SPSS 9.0 for Windows programmal történt. Az egyes vizsgálatok adatainak eloszlását Kolmogorov-Szmirnov teszttel vizsgáltuk. Azoknál a vizsgálatoknál, melyek eredményei normál eloszlást mutattak, az adatanalízishez egytényezős varianciaanalízist alkalmaztunk; így az open field, rotarod, akusztikus ijesztési reflex és pre-

pulse gátlás kísérleti eredmények kiértékelését ANOVA-val végeztük, majd post hoc Scheffe-tesztet használtunk. A térbeli memória vizsgálat nem-normál eloszlást mutató eredményeit non-parametrikus Kruskal-Wallis teszttel elemeztük. Az eltéréseket valamennyi esetben $p < 0,05$ -től kezdődően tekintettük szignifikánsnak. A vizsgálatot a Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Orvos- és Gyógyszerésztudományi Centrum Regionális Humán Orvosbiológiai Kutatásértékelési Bizottsága engedélyezte.

Eredmények

A kognitív funkcióváltozások (térbeli memória, tanulás)

Az öthetes kezelési periódus alatt végzett kognitív magatartás vizsgálatok során a kezelt csoportok memória teljesítménye nem változott meg jelentősen a kontroll csoportéhoz képest (I., II. táblázat). A 0,50 mg/ttkg MeHg-Cl dózissal kezelt állatok memória teljesítménye a bevésés, a referencia- és a 2 órás munkamémória vizsgálati periódusokban csökkenő tendenciát mutatott mind a kontroll, mind a 0,05 mg/ttkg dózissal kezelt állatokhoz képest. Az állatok kognitív vizsgálatának különböző fázisai során lejegyzett futási idők alakulásában nem tapasztaltunk markáns különbségeket a kezelt csoportok között a szubkrónikus kezelést követően (I., II. táblázat).

I TÁBLÁZAT: A kezelési csoportok (n=állatszám/csoport) térbeli memória teljesítmény (%) heti átlagának alakulása (átlag \pm SD) az egyes kognitív magatartás vizsgálati fázisokban.

TABLE I.: Development of the animals' (n=number of animals/group) spatial memory performance (%; mean \pm SD) during the periods of the spatial memory experiment

| Vizsgálati hetek (Experimental weeks) | MeHg-Cl kezelési hetek (Weeks of the MeHg-Cl treatment) | Kognitív magatartás vizsgálati fázisok (The periods of the cognitive behavioral experiment) | A kezelési csoportok heti átlagteljesítménye (%) (átlag \pm SD) a vizsgálati fázisokban (Weekly memory performance (%) during the periods of the behavioral experiment; mean \pm SD) | | |
|--|--|--|--|---|---|
| | | | Kontroll (Control) (n=12) | 0,05 mg/ttkg (0.05 mg/kg b.w.) (n=12) | 0,50 mg/ttkg (0.50 mg/kg b.w.) (n=12) |
| 1. (1 st) | - | Szoktatás (Adaptation) | - | - | - |
| 2. (2 nd) | 1. (1 st) | Bevésés (Acquisition) | 0,75 \pm 0,24 | 0,84 \pm 0,12 | 0,73 \pm 0,06 |
| 3. (3 rd) | 2. (2 nd) | 2 órás térbeli munka memória (Working memory 2 hr) | 0,38 \pm 0,07 | 0,35 \pm 0,12 | 0,34 \pm 0,12 |
| 4. (4 th) | 3. (3 rd) | Referencia memória (Reference memory) | 0,41 \pm 0,21 | 0,40 \pm 0,19 | 0,24 \pm 0,01 |
| 5. (5 th) | 4. (4 th) | 3 órás térbeli munka memória (Working memory 3 hr) | 0,28 \pm 0,11 | 0,37 \pm 0,07 | 0,36 \pm 0,11 |
| 6. (6 th) | 5. (5 th) | 4 órás térbeli munka memória (Working memory 4 hr) | 0,45 \pm 0,11 | 0,32 \pm 0,06 | 0,42 \pm 0,13 |

II. TÁBLÁZAT: A kezelési csoportok (n=állatszám/csoport) heti átlag futásidejének (sec) alakulása (átlag±SD) a kognitív magatartás vizsgálati fázisokban.

TABLE II.: Change of rats' (n=number of animals/group) running time (sec) during the periods of the spatial memory experiment (mean±SD).

| Vizsgálati hetek (Experimental weeks) | MeHg-Cl kezelési hetek (Weeks of the MeHg-Cl treatment) | Kognitív magatartás vizsgálati fázisok (The periods of the cognitive behavioral experiment) | A kezelési csoportok heti átlag futásideje (sec) (átlag±SD) a vizsgálati fázisokban (Weekly running time (sec) during the periods of the behavioral experiment; mean±SD) | | |
|--|--|--|---|---------------------------------------|---------------------------------------|
| | | | Kontroll (Control) (n=12) | 0,05 mg/ttkg (0.05 mg/kg b.w.) (n=12) | 0,50 mg/ttkg (0.50 mg/kg b.w.) (n=12) |
| 1. (1 st) | - | Szoktatás (Adaptation) | - | - | - |
| 2. (2 nd) | 1. (1 st) | Bevésés (Acquisition) | 108,39 ± 28,04 | 97,33 ± 30,66 | 90,72 ± 90,72 |
| 3. (3 rd) | 2. (2 nd) | 2 órás térbeli munka memória (Working memory 2 hr) | 59,10 ± 7,38 | 97,00 ± 49,79 | 63,40 ± 63,40 |
| 4. (4 th) | 3. (3 rd) | Referencia memória (Reference memory) | 65,87 ± 25,06 | 67,50 ± 16,01 | 57,10 ± 57,10 |
| 5. (5 th) | 4. (4 th) | 3 órás térbeli munka memória (Working memory 3 hr) | 101,40 ± 45,17 | 135,43±106,25 | 62,03 ± 62,03 |
| 6. (6 th) | 5. (5 th) | 4 órás térbeli munka memória (Working memory 4 hr) | 54,43 ± 17,17 | 93,43 ± 55,13 | 45,33 ± 45,33 |

A motoros koordináció

A vizsgálat hetedik hetében végzett motoros koordinációs vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy a 0,50 mg/ttkg dózissal MeHg-Cl-dal kezelt csoport 5 perces

rotarod teljesítménye szignifikánsan csökkent a kontroll és a 0,05 mg/ttkg dózissal kezelt csoportokhoz képest. A 0,05 mg/ttkg dózissal kezelt állatok rotarod teljesítményében a MeHg-Cl expozíció nem okozott jelentős csökkenést (1. ábra).



1. ábra: A kezelési csoportok 5 percig mért rotarod teljesítményének alakulása (átlag±SD).

Ordináta: kezelési csoportok; Abszcissa: az állatok fennmaradási ideje a rotarodon (sec)

*p<0,05 a kontroll csoporthoz; # p<0,05 a 0,05 mg/ttkg MeHg-Cl kezelt csoporthoz viszonyítva

Fig. 1.: The rats' rotarod performance measured in five minutes (mean±SD).

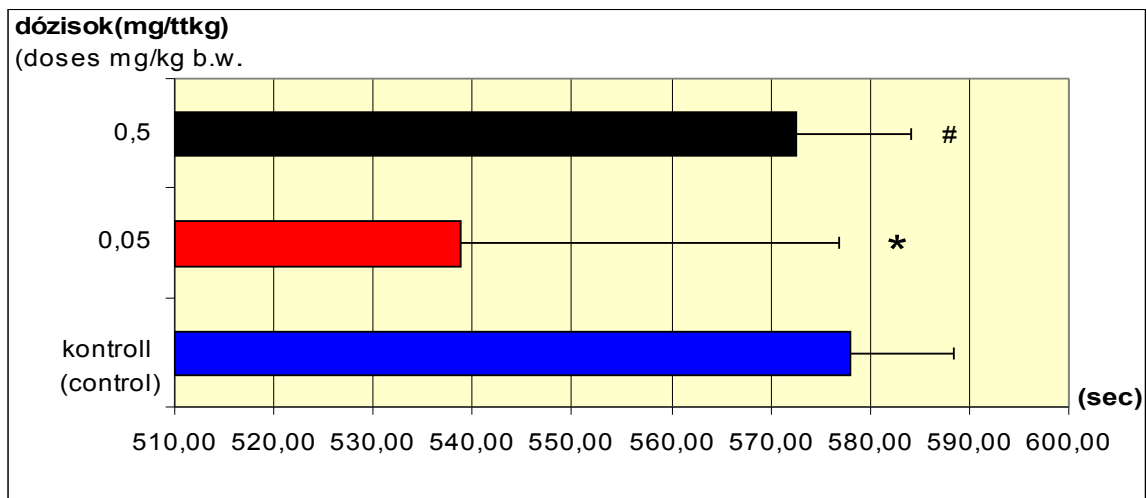
Ordinate: treatment groups; Abscissa: time of stay at the top of the rotating rod (sec)

* p<0.05 vs. the control group; # p<0.05 vs. the 0.05 mg/kg b.w. MeHg-Cl treated group

A spontán lokomotoros aktivitás

Az open field teszt eredményei azt mutatták, hogy a 0,05 mg/ttkg MeHg-Cl dózissal kezelt csoport 10 perces teljes spontán exploratív aktivitása szignifikánsan csökkent a kontroll és a 0,50 mg/ttkg dózissal kezelt csoportokhoz képest. A kis dózissal kezelt csoport készletesség aktivitásának mérséklődését

elsősorban a vertikális irányú (ágaskodás) mozgáskomponens jelentős csökkenése eredményezte. A 0,05 mg/ttkg dózissal kezelt csoportban emellett az aktív mozgás nélkül (mozdulatlanul) töltött idő, valamint a lokális helyzetváltató (mosakodás aktivitási) idő szignifikáns emelkedése is észlelhető volt. Ezek a különbségek a 0,50 mg/ttkg dózissal kezelt csoportokhoz viszonyítva szintén szignifikánsnak mutatkoztak (2A, 2B ábra).



2/A ábra: A kezelési csoportok 10 perces spontán lokomotoros aktivitásának alakulása (átlag \pm SD).

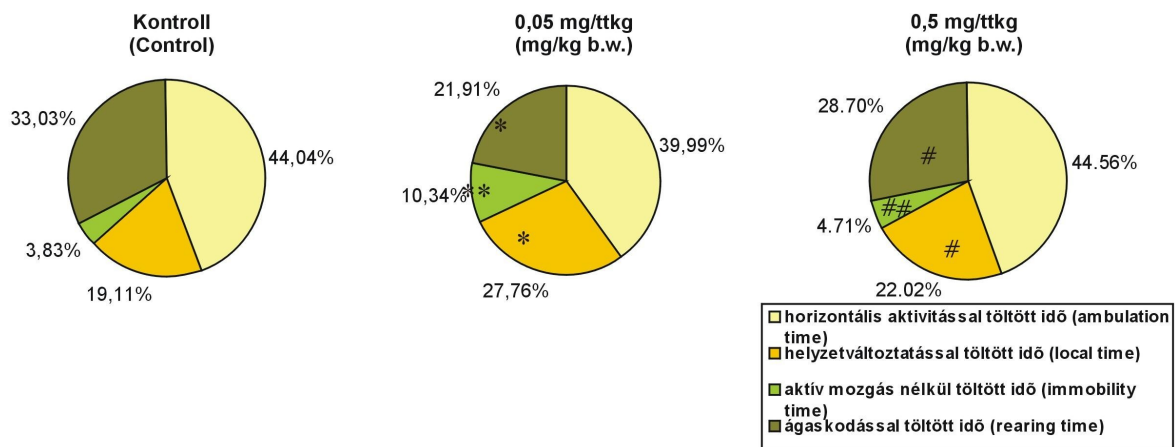
Ordináta: kezelési csoportok; Abszcissa: a kezelési csoportok aktív mozgással töltött ideje (sec)

* $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz; # $p < 0,05$ a 0,05 mg/ttkg MeHg-Cl kezelt csoporthoz viszonyítva

Fig. 2/A: The rats' spontaneous locomotor activity during 10 minute session (mean \pm SD).

Ordinate: treatment groups; Abscissa: duration of the total locomotor activity of the treatment groups (sec)

* $p < 0.05$ vs. the control group; # $p < 0.05$ vs. the 0.05 mg/kg b.w. MeHg-Cl treated group



2/B ábra: A teljes spontán lokomotoros aktivitás négy fő mozgástípus komponensének aránya (%) a kezelési csoportokban.

* p<0,05; ** p<0,01 a kontroll csoporthoz; # p<0,05; ## p<0,01 a 0,05 mg/ttkg MeHg-Cl kezelt csoporthoz viszonyítva

Fig. 2/B: Distribution (%) of the time spent with the main components of the spontaneous locomotor activity.

* p<0.05; ** p<0.01 vs. the control group; # p<0.05; ## p<0.01 vs. the 0.05 mg/kg b.w. MeHg-Cl treated group

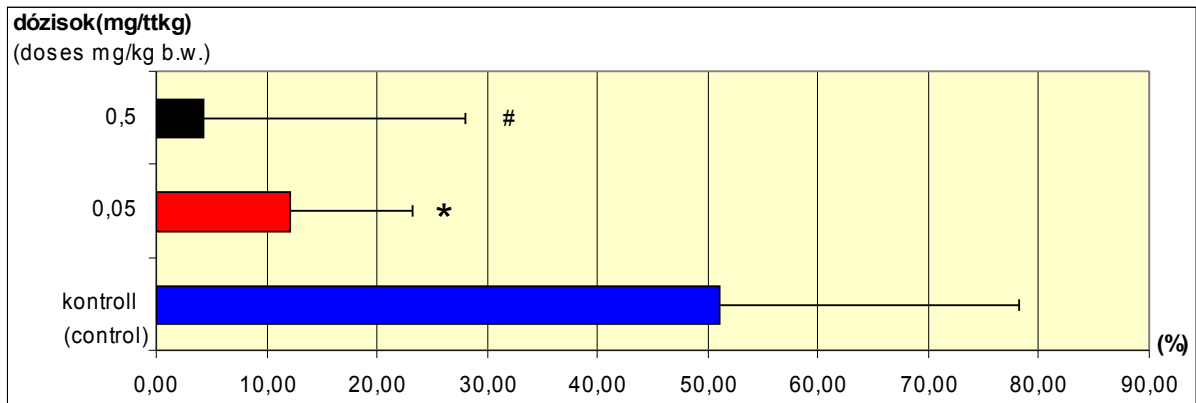
Az ijesztési reflex reakció és a szenzomotoros gátlás

A vizsgálat hetedik hetében végzett ASR és PPI eredmények a patkányok csökkent pszichomotor működését jelezték. Mindkét MeHg-Cl dózissal kezelt csoportban a pre-pulse gátlás mértéke jelentős és dózisfüggő csökkenő tendenciát mutatott a kontroll csoporthoz viszonyítva.

Valamennyi kezelt állat „zaj-pozitív” ASR válaszainak latenciája, csúcs- és átlag amplitúdója, és a csúcsamplitúdó elérési ideje mérsékelt csökkenő tendenciát

mutatott a kontroll állatokhoz képest. A kezelt állatok pre-pulse gátlást követő ASR válaszai, a latencia és a csúcsamplitúdó elérési idejének értékei a kontroll állatok válaszaihoz képest lecsökkentek.

A 0,50 mg/ttkg dózissal kezelt patkányok csúcsamplitúdója szignifikánsan növekedett a 0,05 mg/ttkg dózissal kezelt csoporthoz viszonyítva, illetve az átlag amplitúdók nagysága jelentős emelkedést mutatott a kontroll csoporthoz képest (3. ábra, III. táblázat)



3. ábra: A kezelési csoportok szenzomotor gátlás teljesítményének (PPI %) alakulása (átlag±SD).

Ordináta: a kezelési csoportok; Abszcissa: a PPI teljesítmények (%);

* p<0,05 a kontroll csoporthoz; # p<0,05 a 0,05 mg/ttkg MeHg-Cl kezelt csoporthoz viszonyítva

Fig. 3.: Sensorimotor performance of the treatment groups (PPI%) (mean±SD).

Ordinate: treatment groups; Abscissa: the PPI performance (%);

*p<0.05 vs. the control group; # p<0.05 vs. the 0.05 mg/kg b.w. MeHg-Cl treated group

III. TÁBLÁZAT: A kezelési csoportok ASR és pre-pulse gátlást követő „zaj-pozitív” válaszainak paramétereit (átlag±SD).

* p<0,05 a kontroll csoporthoz; # p<0,05 a 0,050 mg/ttkg MeHg-Cl kezelt csoporthoz viszonyítva

TABLE III.: Parameters of noise-positive acoustic startle responses (ASR) without and with pre-pulse stimulus (PPI) of control and treated animals (Mean±SD).

*p<0.05 vs. the control group; # p<0.05 vs. the 0.05 mg/kg b.w. MeHg-Cl treated group

| Vizsgálat (Senzorimotor tests) | Kezelési csoportok (mg/ttkg) (Groups; mg/kg b.w.) | Az ASR és PPI vizsgálatok mért paramétereit a kezelési csoportokban (Measured parameters of the noise positive responses in the ASR and PPI tests of the control and treated groups) | | | | |
|-----------------------------------|--|---|--|---|---|---|
| | | Latencia idő (ms) (Onset latency; ms) | Csúcs amplitúdó (g) (Peak amplitude; g) | Csúcs ampl. elérési idő (ms) (Peak time; ms) | Átlag amplitúdó (g) (Average amplitude; g) | PPI % (%) (Performance of the pre-pulse inhibition; %) |
| ASR | kontroll (control) | 18,16±1,86 | 388,90±128,82 | 27,52±2,77 | 86,72±33,26 | - |
| | 0,05 mg/ttkg | 17,09±4,55 | 297,38±131,84 | 24,74±6,52 | 68,31±30,36 | - |
| | 0,50 mg/ttkg | 16,74±4,86 | 314,85±197,77 | 24,38±6,76 | 75,40±49,84 | - |
| PPI | kontroll (control) | 19,15±2,69 | 220,96±117,53 | 26,77±6,14 | 44,77±22,72 | 51,06±27,11 |
| | 0,05 mg/ttkg | 17,10±1,30 | 168,97±7,089 | 24,16±2,06 | 48,01±12,72 | 12,18±10,99 * |
| | 0,50 mg/ttkg | 17,61±3,62 | 333,01±129,24 # | 24,67±4,02 | 74,39±23,71 * | 4,20±23,74 # |

Megbeszélés

Kísérletünkben szubkrónikus MeHg-Cl expozíciót modelleztük fiatal, felnőtt Wistar patkányok per os 5 hetes kezelésével. A dóziszválasztást a NOEL-értékből kiindulva 0,50 mg/ttkg és 0,05 mg/ttkg-ban határoztuk meg.

A kognitív magatartás vizsgálatok eredményei és az intézetünkben korábban 5 hétig gyomorszondával adagolt MeHg-Cl 0,50 mg/ttkg dózissal végzett kísérletekben történt szöveti (vér, agykéreg, hipokampusz, femur) Hg-tartalom meghatározások adatai alapján valószínűsíthető, hogy az 5 hétig per os adagolt MeHg-Cl mindkét kezelési csoport állatainak emésztő traktusából felszívódott, és a fiziológiás membrán barrieret át lépve bejutott a központi idegrendszerbe (25).

A MeHg modulálja a centrális neuronális köröket és/vagy neurokémiai rendszereket, mely a transzmitterek szintézise, kibocsátása, felvétele, vagy a depolarizációs feszültség csökkentése révén valósul meg (16, 26).

A striatális dopaminerg rendszer felelős a lokomotoros aktivitás, a figyelem, az exploratív viselkedés, a motiváció és a jutalmazás kialakításáért. A dopamin rendszer és a MeHg kölcsönhatására irányuló vizsgálatokból kiderült, hogy a MeHg növeli az extracelluláris dopaminszintet a patkányok striatális szöveteiben [27]. A mezolimbikus és nigrostriatális dopaminerg pályák sérülései pedig az extrapiramidális mozgásvezérlés és a szenzomotoros integráció zavarát okozzák.

Az öthetes kezelést követően elvégzett open field tesztben a 0,05 mg/ttkg MeHg-Cl dózissal kezelt csoport 10 perces teljes lokomotoros aktivitása szignifikáns csökkenést mutatott, melyet elsősorban a vertikális (ágaskodás) irányú aktivitás redukciója eredményezett. Emellett a nagy dózissal kezelt állatok markáns

koordinációs teljesítmény-csökkenése utalhat még a fent említett régiók érintettségére.

A PPI% a szenzomotoros gátlás mértékét jellemzi. A PPI esszenciális folyamat, amely a szenzoros bemenetre adott automatikus motoros választ jelenti. A skizofrénia és más kognitív abnormalitásokkal járó neurológiai betegségekben is tapasztalható a szenzomotoros gátlás csökkenése (28). A gátlás (PPI) folyamatát a kortiko-striato-pallido-pontin pályával (ASR) összefüggő kortiko-striato-pallido-talamikus pálya szabályozza. Humán és állatkísérletes pszichofarmakológiai vizsgálatokkal igazolt, hogy egyes neurotoxikus ágensek (alkohol, dopamin agonisták) hatására a PPI paraméterek alakulása a regulációban résztvevő neurokémiai anyagok változásainak tudható be (glutamát, acetilkolin, dopamin) (29).

A mindkét kezelési csoportban szignifikáns eltérést mutató pre-pulse gátlás a szenzomotoros és a motoros apparátus egyidejű funkcionális károsodására utal.

Vizsgálati modellrendszerünkkel kapott eltérésekből következtethetünk arra, hogy melyek azok a paraméterek és célzott vizsgálatok, melyek fokozottan érzékenyek a relatíve alacsony dózisu szubkrónikus MeHg-Cl orális adagolás okozta neurológiai elváltozások korai detektálására (open field aktivitás, PPI % teljesítmény), és melyek azok a tesztek (rotarod, 8-karú sugaras útvesztő), amelyek pedig a magasabb koncentráció okozta magatartásváltozások regisztrálására használhatók.

Jelen kísérletünk eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy a komplex magatartás-toxicológiai vizsgálati modellrendszerünkkel, már a 0,05 mg/ttkg dózisu MeHg-Cl szubkrónikus orális expozíciót követően regisztráltunk magasabb rendű idegrendszeri eltéréseket, melyek a

neuronális működés háttérében álló egyes agyrégiók érintettségére utalnak.

Így igazoltta vált a komplex magatartás tesztek alkalmazhatósága a neurotoxikus xenobiotikumok okozta effektusok korai

detektálására, illetve a mérgezések nyomon követésére. Ezen komplex magatartás vizsgálati metodika segítségével lehetőség nyílt más neurotoxinként viselkedő xenobiotikumok okozta idegrendszeri változások vizsgálatára is.

IRODALOM

1. *Nriagu J. O.*: Global metal pollution. *Environment* 1990. 33. 7-33.
2. *Pacyna E. G., Pacyna J.M.*: Global emission of mercury from anthropogenic sources in 1995. *Water, Air and Soil Pollut.* 2002. 137. 149-165.
3. *Beim A. M., Grosheva E. I.*: Ecological chemistry of mercury contained in bleached kraft pulp mill effluents. *Water, Air and Soil Pollut.* 1992. 65. 135-141
4. USEPA. "Mercury study report to Congress EPA-452/R-97-004." USEPA, 1997.
5. *Möller-Masden B., Danscher G.*: Localization of mercury in CNS of the rat. IV. the effect of selenium on orally administered organic and inorganic mercury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1991. 108. 453-473.
6. *Jensen S., Jernelov A.*: Biological methylation of mercury in aquatic organisms. *Nature* 1969. 223. 753-754.
7. *Wang Q., Kim D., Dionysiou D.D., et al.*: Sources and remediation for mercury contamination in aquatic systems. *Environment. Pollut.* 2004. 131. 323-336.
8. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration: Mercury concentrations in fish: FDA Monitoring Program 1990-2004.
9. Honlap. "EPA (EPA-823-F-01-011) Mercury update: Impact on Fish Advisories. 2001.
10. Honlap. "SACN (Scientific Advisory Committee on Nutrition) Report: Advice on fish consumption: benefits&risks. 2004.
11. *Shigeo E., Mari S., Tadashi N., et al.*: Minamata disease revisited: An update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. *J. Neurol. Sci.* 2007. 262. 131-144.
12. *Aschner M., Aschner J.L.*: Mercury neurotoxicity: mechanisms of blood-brain barrier transport. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1990. 14. 169-176.
13. *Morel F.M.M., Kraepiel A.M.L., Amyot M.*: The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1998. 29. 543-566.
14. *Burbacher T. M., Rodier P.M., Weiss B.*: Methylmercury developmental neurotoxicity: a comparison of effects in humans and animals. *Neurotoxicol. Teratol.* 1990. 12. 191-202.
15. *Choi B. H.*: The effects of methylmercury on the developing brain. *Prog. Neurobiol.* 1989. 32. 447-470
16. *Carratù M.R., Borracci P., Coluccia A., et al.*: Acute exposure to methylmercury at two developmental windows: focus on neurobehavioral and neurochemical effects in rat offspring. *Neuroscience* 2006. 141. 1619-1629.
17. *Kakita A.K., Wakabayashi M., Su Y., et al.*: Intrauterine methylmercury intoxication. Consequence of the inherent brain lesions and cognitive dysfunction in maturity. *Brain Res.* 2000. 877. 322-330.
18. *Bapu T. C., Purohit R. C., Sood P.P.*: Fluctuation of trace elements during methylmercury toxication, and chelation therapy. *Hum. Exp. Toxicol.* 1994. 13. 815-823.
19. *Aschner M., Yao C.P., Allen J.W., et al.*: Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. *Neurochem. Int.* 2000. 35. 431-438.
20. *Bartolome J., Whittmore W.L., Seidler F.J., et al.*: Exposure to methylmercury in utero: effects on biochemical development of catecholamine neurotransmitter system. *Life Sci.* 1984. 35. 657-670.
21. *Johansson C., Castoldi F. A., Onishchenko N., et al.*: Neurobehavioural and molecular changes induced by methylmercury exposure during development. *Neurotox. Res.* 2007. 11. 241-260
22. *Zanoli P., Truzzi C., Veneri C., et al.*: Methyl mercury during late gestation affects temporarily the development of cortical muscarinic receptors in rats offspring. *Pharmacol. Toxicol.* 1994. 75. 261-264.
23. *Shapiro I.M., Cornblath D.R., Sumner A.J.*: Neurophysiologic and neuropsychologic function of mercury exposed dentists. *Lancet* 1982. 1. 1147-1150
24. *Koch M.*: The neurobiology of startle. *Prog. Neurobiol.* 1998. 59. 107-128
25. *Vezér T., Papp A., Kurunczi A., et al.*: Behavioral and neurotoxic effects seen during and after subchronic exposure of rats to organic mercury. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2005. 19. 785-796.
26. *Kumolainen H., Tuomisto J.*: Interference of methylmercury with monoamine uptake and release in rat brain synaptosomes. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 1981. 48. 214-222

27. *Faro L. R., Nascimento J.L., Duran R.:* Mechanism of action of methylmercury on in vivo striatal dopamine release. Possible involvement of dopamine transporter. *Neurochem. Int.* 2002. 40. 455-465.
28. *Braff D.L., Geyer M. A., Swerdlow N.R.:* Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups and pharmacological studies. *Psychopharmacol.* 2001. 156. 234-258.
29. *Smith D.A., Boutros N.N.; Schwarzkopf S.B.:* Reliability of P50 auditory event related potential indices of sensory gating. *Psychophysiology* 1994. 31. 495-502.

EDINA HORVÁTH, TÜNDE VEZÉR

Department of Public Health

Faculty of Medicine, University of Szeged

6720 Szeged, Hungary

Dóm tér 10

Phone: 36-62-545-119

Fax: 36-62-545-120

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

Examination of higher neurological functional changes in rats elicited by the dosage of an organic mercury compound

Abstract: Metals have been known and used by mankind long since. An ample body of literature data is available about adverse effects of heavy metals like mercury, lead, or cadmium. In spite of their toxic effects, the usage of metals is inevitable, which finally results in continuous exposure of the population. Consequently, the examination of the toxic effects of metals and their underlying mechanisms is essential in practical aspect. In the present experiment, low dose subchronic exposure was modelled. Young adult male Wistar rats were treated with methyl-mercury chloride (MeHg-Cl), per os by gavage (n=12 rats/group) with doses of 0.50 mg/kg b.w. and 0.05 mg/kg b.w., for 5 weeks (5 times a week). The effects of MeHg-Cl on higher order functions of the brain were investigated by a complex behavioral-toxicological approach (spontaneous locomotor activity, psychomotor performance, sensorimotor inhibition, short term memory performance, motor coordination). Significant decrease of the spontaneous locomotor activity was found in the low dose group, and of the motor coordination in the high dose group. Pre-pulse inhibition performance (PPI %) indicated significant diminution in both treated groups. The simultaneous changes of psychomotor, sensorimotor gating and locomotor activity detected refer to the dysfunction of certain subcortical regions (basal ganglia and cerebellum). Accordingly, the applied complex methodology enables early recognition of the neurological dysfunctions caused by MeHg-Cl.

Keywords: methyl-mercury chloride, spatial memory, spontaneous locomotor activity, motor coordination, sensorimotor performance
