

Helmholtz Zentrum München, Abteilung Analytische BioGeoChemie

## Manganexposition und neurodegenerative Erkrankungen – Untersuchungen mittels Mn-Speziesanalytik

Bernhard Michalke

*B. Michalke: Manganexposition und neurodegenerative Erkrankungen – Untersuchungen mittels Mn-Speziesanalytik. Zbl Arbeitsmed 62 (2012) 156–158*

**Schlüsselwörter:** Mangan – Speziation – Parkinsonismus – Mn-Citrat

### Zusammenfassung

Die zunehmende Manganexposition aus der Umwelt und an manchen Arbeitsplätzen stellt zunehmend ein Problem dar, da als Folge eine Schädigung des Zentralnervensystems auftreten kann, die im schlimmsten Fall zu Manganismus, einer Parkinson-ähnlichen Erkrankung führen kann. In diesem Beitrag wurden daher Methoden der Elementspeziation – Kopplungsverfahren aus Chromatographie (oder Kapillarelektrophorese) mit elementselektiver ICP-MS Detektion – eingesetzt, um die Verteilung verschiedener Mn-Verbindungen im Serum und Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) zu untersuchen. Mit dieser Mangan Speziesanalytik konnten neben den physiologischen Mn-Spezies auch die Mn-Verbindungen gemessen werden, die besonders bei erhöhter Exposition im Organismus gebildet werden, und im Folgenden jene identifiziert werden, die besonders leicht und offenbar wenig kontrolliert über die neuronale Schranke ins Gehirn gelangen und dort vor allem im Globus Pallidus schädigend wirken. Es handelt sich überwiegend um ein kleines Molekül, nämlich Mn-Citrat, welches sogar in CSF angereichert wird. Dieses Ergebnis konnte auch in einem daraufhin durchgeführten Tierexperiment nach einmaliger Exposition bestätigt werden. Abschließend werden neueste Untersuchungen vorgestellt, basierend auf diesen Ergebnissen, möglichst einfache Verfahren zu entwickeln um aussagekräftige Biomarker im Serum für erhöhtes Mn-Citrat im CSF zu finden.

## Manganese Exposure and Neurodegenerative Diseases- Investigations with Mn Speciation Analysis

*B. Michalke: Manganese Exposure and Neurodegenerative Diseases- Investigations with Mn Speciation Analysis. Zbl Arbeitsmed 62 (2012) 156–158*

**Key words:** Manganese – Speciation – Parkinsonism – Mn-Citrate

### Abstract

The increasing manganese exposure from the environment and at some workplaces is increasingly a problem, since Mn can damage the central nervous system. In the worst case Mn exposure causes “manganism”, a Parkinson-like disease. In this paper methods of element speciation – coupling methods of chromatography (or capillary electrophoresis) with element-selective ICP-MS detection – are used to investigate the distribution of various Mn compounds in serum and cerebrospinal fluid (CSF). When using this manganese species analysis not only the physiological Mn species are monitored but also Mn compounds are measured, which are specifically present in the body after increased exposure. These new Mn-species must be identified since they are transported fast and without efficient control across the neural barrier into the brain and where they are found primarily in the globus pallidus. It turned out that predominantly a small molecule, namely Mn-citrate, is facilitated crossing the barrier and is actually enriched in CSF. This result was confirmed in a subsequent animal experiment with a single i.v. Mn exposure. Based on these results, recent studies are presented developing the simplest possible method to provide a meaningful biomarker in serum for increased Mn-citrate in the CSF.

---

Anschrift des Autors:

Prof. Dr. rer.nat. Bernhard Michalke  
Helmholtz Zentrum München ■ Abteilung Analytische BioGeoChemie  
Ingolstädter Landstr. 1 ■ 85764 Neuherberg

## Einleitung

Die Manganexposition nimmt einerseits im arbeitsmedizinischen als auch im umweltmedizinisch relevanten Bereich ständig zu. Expositionsquellen finden sich etwa im Arbeitsumfeld von Schweißern, bei der Metallverarbeitung, bei Phosphatierung von Stahlblechen, bei Minenarbeitern aber genauso bei Bewohnern in der Umgebung solcher Industrieanlagen.

Bereits 1837 stellte Couper (Couper 1837) fest, dass vor allem inhalative Mn-Exposition zu einer Reihe von neurologischen Symptomen führen kann, die schließlich zu einem Krankheitsbild sehr ähnlich einer Parkinsonerkrankung führt. Seither wurden diese Zusammenhänge vielfach untersucht und bestätigt (Barceloux 1999, Gerber et al., 2002, Takeda 2003, Crossgrove & Zheng 2004, Dobson et al., 2004). Allerdings ist Mangan auch ein essentielles Spurenelement. Die unterschiedlichen Wirkungen können mittels unterschiedlicher Stoffwechselwege (Metabolismus) und somit über andere Mn-Metabolite, also Mn-Spezies, erklärt werden. Mn-Speziesanalytik untersucht und identifiziert diese Mn-Verbindungen im Organismus.

## Methodik

Gepaarte Serum und Cerebrospinalflüssigkeits (CSF)-proben wurden während neurologischer Routineuntersuchungen am Krankenhaus „Rechts der Isar“ in München gesammelt. Zustimmung der Patienten zu weiteren wissenschaftlichen Untersuchungen lag vor. Die Proben wurden mittels online gekoppelter Größenausschlusschromatographie (SEC)-ICP-DRC-Massenspektrometrie (MS) und Kapillarelektrophorese (CE)-ICP-DRC-MS analysiert. Detaillierte Angaben zu den Methoden sind z.B. bei Michalke et al., 2007, aufgeführt. Die Methodenparameter sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

## Ergebnisse

Zunächst wurden Poolproben von Serum und CSF gemessen, um die Stabilität der Mn-Spezies während der SEC- bzw. CE-Trennungen zu überprüfen und eine Mn-Speziesverteilung unabhängig von individuellen Schwankungen zu be-

stimmen. Im Serum lag Mn überwiegend als Mn-Transferrin vor, in geringerer Konzentration auch als  $\alpha$ -2-Makroglobulin, Mn-Albumin und als eine zunächst nicht näher identifizierte, niedermolekulare Mn-Spezies. Diese konnte im Weiteren als Mn-Citrat bestimmt werden. Im CSF wurden praktisch keine hochmolekularen Mn-Verbindungen (Proteine) gefunden, sondern ausschließlich kleine Mn-Spezies. Mittels CE-ICP-DRC-MS konnten davon 9 Verbindungen identifiziert werden, wobei Mn-Citrat der quantitativ bedeutendste Mn-Metabolit war (Abbildung 1).

In den gepaarten Proben konnten diese Befunde bestätigt werden. Zusätzlich wurden die Ratios (CSF/Serum) der wichtigsten Mn-Spezies bestimmt, nämlich von Mn-Transferrin, Mn-Citrat,

anorganischem Mn und Gesamt-mangan. Dabei zeigte sich, dass sowohl Gesamt-mangan, als auch anorganisches Mn Konzentrationsverhältnisse (CSF/Serum) von 0,5 – 0,6, Mn-Transferrin sogar nur von 0,1 aufwiesen. Diese Mn-Spezies waren im CSF also deutlich abgereichert. Im Gegensatz dazu war Mn-Citrat jedoch um den Faktor 5,4 in CSF stark angereichert.

## Diskussion

Die hier gefundenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass Mn neben den bekannten, physiologischen Transportern wie Transferrin auch niedermolekulare Spezies, vor allem Citrat, nutzen kann. Während der Transport von Mn über die neuronalen Schranken beim Mn-Transferrin streng vom Transferrin-Rezeptor-

Tabelle 1: Geräteparameter

SEC Parameter	
HPLC Instrument:	Beckman 127 NM (bio-kompatibel PEEK-) HPLC
Eluent:	Tris-HCl (10 mM, pH 7.4)
Flußrate:	1 mL/min
Säule:	Krannich (500 x 20 mm), gefüllt mit TSK HW 55 F (Tosoh), bzw. mit TSK SW 40
CE Parameter	
Instrument:	„Biofocus 3000“, Bio-Rad (München)
Kapillare:	120 cm x 50 $\mu$ m ID, nicht ge-coated
Elektrolyt/Puffer-Sandwich:	inlet: Na –Acetate 200 mM, pH 6.2, Kapillare und outlet: 10 mM Borat Puffer, pH 8.3
Hochspannung:	– 18 kV
ICP-MS-Interface:	MCN Zerstäuber mit T-Stück für „Sheathflow“ (50 $\mu$ L min <sup>-1</sup> , 10 mM Borat Puffer, pH 8.3), Kapillareinführung und Auslass-elektrode
ICP-MS Parameter	
Instrument:	ELAN DRC II, Perkin Elmer (Sciex, Toronto, Canada), graphic mode.
Isotop:	<sup>55</sup> Mn
RF Leistung:	1250 W
Plasmagas:	15 L Ar min <sup>-1</sup>
Zerstäubergas:	0,85 L Ar min <sup>-1</sup>
Dwell time:	200 ms
Dynamic Reaction Cell (DRC) Gas:	NH <sub>3</sub> bei 0,56 ml min <sup>-1</sup>
DRC Band Pass (q):	0,45

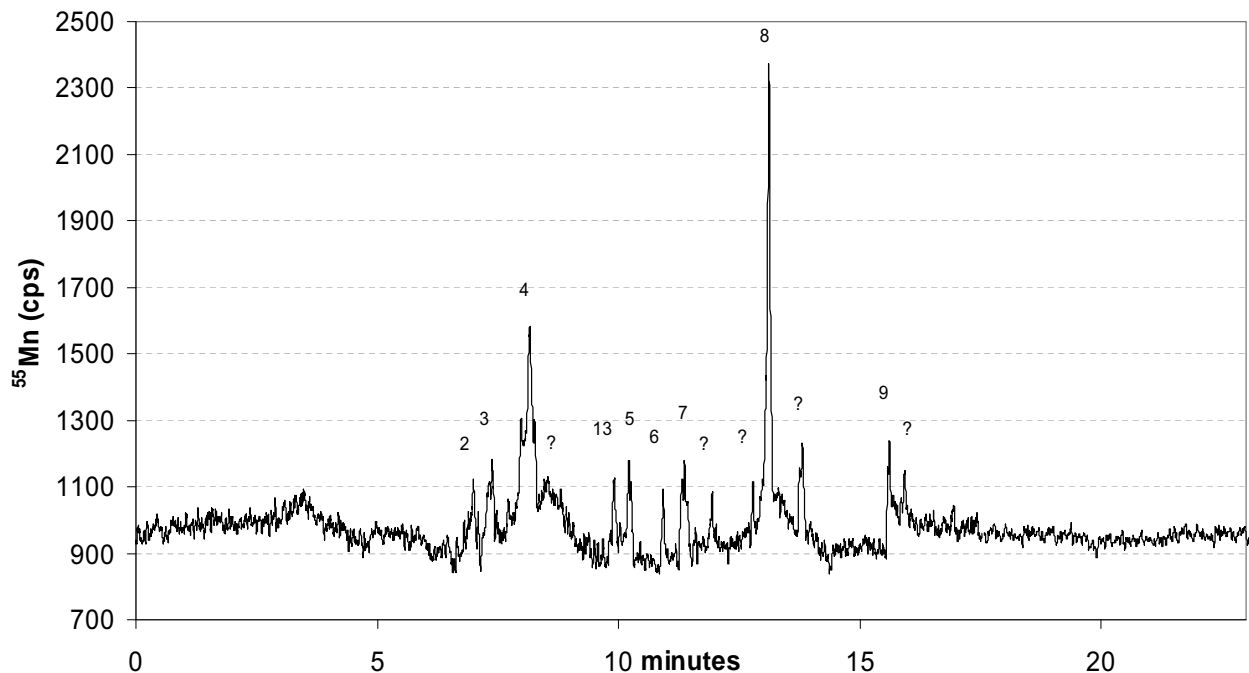


Abbildung 1: CE-ICP-DRC-MS Electropherogram einer CSF Probe: (2) Mn-histidine, (3) Mn-fumarate, 4 Mn-malate, 5 Mn Oxalacetate, 6 Mn- $\alpha$ -Ketoglutarate, 7 Mn-NAD, 8 Mn-Citrat, 9 Mn-Adenosin, 13 anorganisches Mn, ? kein Standard-Match. Mit Erlaubnis reproduziert von Michalke et al. 2007.

Shuttle kontrolliert wird, ist dies beim Mn-Citrat nicht der Fall – im Gegenteil: Es kommt sogar zu einer Anreicherung. Deshalb wird ein aktiver Transportmechanismus diskutiert. Die besondere Bedeutung von Mn-Citrat im Rahmen von neurodegenerativen Symptomen wurde auch von Aschner und Mitarbeiter (Aschner 2000) diskutiert. Der Befund konnte auch mit einem Tierexperiment bei exakt dosierter, einmaliger i.v. Exposition bestätigt werden (Diederich et al., in press). Ferner haben Yokel & Crossgrove (Yokel & Crossgrove 2004) in Perfusionsexperimenten gezeigt, dass verschiedene Mn-Verbindungen unterschiedlich schnell über die neuronale Schranke transportiert werden, wobei Mn-Citrat mit großem Abstand den schnellsten Übertritt aufwies. Mn-Citrat scheint somit zu den wichtigsten Mn-Spezies in Zusammenhang mit Mn-abhängigen neurodegenerativen Erkrankungen zu zählen.

Da Mn-Biomonitoring in Blut, Serum oder Urin häufig keine klare Abgrenzung zwischen Kontrollgruppen (z.B. 7–15  $\mu\text{g/L}$  im Blut) und exponierten Personen (meist 8–25  $\mu\text{g/L}$ , seltener bis max. 60  $\mu\text{g/L}$  im Blut) erlauben, wird derzeit untersucht, ob bestimmte Manganspezies im Serum eine ausreichende Korrelation zu Mn-Citrat in CSF aufweisen. Ein solcher Zusammenhang gemeinsam mit einem einfacheren und billigeren Bestimmungsverfahren soll dann als breiter einsetzbare Biomonitoringmethode zur Verfügung stehen.

#### Literatur

Aschner M (2000) Manganese: Brain Transport and Emerging Research Needs, *Environ Health Perspectives* 108/S3: 1–6  
 Barceloux DG, Manganese, *Clin. Toxicol.*, 1999, 37: 293–307.  
 Crossgrove J, Zheng W (2004) Manganese toxicity upon overexposure. *NMR Biomed* 17: 544–553.

Couper J (1837) Br. On the effects of black oxide of manganese when inhaled into the lungs. *Ann Med Pharmacol* 1: 41–42.

Diederich J, Brielmeier M, Schwerdtle T, Michalke B, Manganese and iron species in Sprague-Dawley rats exposed with  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (i.v.), *Microchem. Journal*, in press.

Dobson AW, Erikson KM, Aschner M (2004) Manganese neurotoxicity. *Ann NY Acad Sci*, 1012: 115–128.

Gerber GB, Leonard A, Hantson P (2002) Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of manganese compounds. *Crit Rev Oncol Hematol*, 42: 25–34.

Michalke B, Berthele A, Mistrionis P, Ochsenkühn-Petropoulou M, Halbach S (2007) Manganese species from human serum, cerebrospinal fluid analyzed by size exclusion chromatography-, capillary electrophoresis coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Trace Elem Med Biol* 21: 4–9.

Takeda A (2003) Manganese action in brain function, *Brain Res. Rev.*, 41: 79–87.

Yokel RA, Crossgrove JS (2004) Manganese Toxicokinetics at the Blood Brain Barrier. *Health Effects Institute Research Report*, 119: 1–84.