

Ocena parametrów stresu oksydacyjnego w mózgach szczurów intoksykowanych manganem

MARCIN ZAWADZKI, KRYSZYNA PAWLAS, ARTUR NIEDŹWIEDŹ*,
EUGENIA MURAWSKA-CIAŁOWICZ**, LIDIA JANUSZEWSKA, JÓZEF NICPOŃ*

Katedra i Zakład Higieny Wydziału Lekarskiego AM, ul. Mikulicza-Radeckiego 7, 50-345 Wrocław

*Katedra Chorób Wewnętrznych i Pasożytniczych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP,
pl. Grunwaldzki 47, 50-366 Wrocław

**Katedra i Zakład Biochemii i Fizjologii AWF, al. Paderewskiego 35, 51-612 Wrocław

Zawadzki M., Pawlas K., Niedźwiedź A., Murawska-Ciałowicz E., Januszewska L., Nicpoń J.
Evaluation of oxidative stress from manganese intoxication on rats' brains

Summary

The significance of manganese as an environmental pollutant has increased in previous years. In this study the authors present the influence of chronic exposure of manganese on oxidative stress parameters. Depending on the position in the brain, the authors observed the following changes: decrease of GPx and GR activity in the brain stem, similarly in the cerebellum; in the brain's hemispheres, however, an increase of GST activity and a decrease of GR activity was observed. CAT activity in all these three structures remained at a lower, constant level.

Keywords: manganese, oxidative stress, rats, brain

Mangan jest metalem powszechnie występującym w środowisku naturalnym. Średnie stężenie tego pierwiastka w wodzie morskiej wynosi 0,0019 µg/g, zaś średnia zawartość w skorupie ziemskiej 670 µg/g (24).

Zawartość manganu w organizmie zwierząt i ludzi jest różna, w zależności od tkanki. Największe stężenie obserwuje się w miększu wątroby (1,5-1,7 µg/g mokrej tkanki), najniższe zaś w tkance tłuszczowej i kostnej (0,06-0,07 µg/g mokrej tkanki) (16).

Ilość manganu wchłanianego przez organizm znacznie wzrosła w ciągu ostatnich lat. Za główną przyczynę tego zjawiska należy uznać narastające zanieczyszczenie środowiska. Bardzo duże ilości manganu są uwalniane do atmosfery w wyniku działania przemysłu. Od kilkunastu lat, w niektórych krajach, do benzyny dodaje się metylocyklopentadienylotrikarbonylek manganu (MMT), jako środek uszlachetniający paliwo. Wpływ MMT na organizm ludzi i zwierząt jest obecnie przedmiotem wielu badań (7, 10, 11, 25, 26).

Toksyczny wpływ jonów manganu obserwuje się przede wszystkim w obrębie dwóch narządów – mózgu i płuc, przy czym stopień uszkodzeń zależy od drogi przyjęcia. W przypadku drogi inhalacyjnej efekty toksyczne obserwuje się wpływ zarówno w mózgu, jak i układzie oddechowym, przy podaniu doustnym uszkodzenia narządowe są niewielkie, ponieważ pierwiastek ten jest bardzo szybko metabolizowany i wydalany z kałem.

Badania mechanizmów cytotoksyczności manganu sugerują, że wywołuje on w komórce zjawisko stresu oksydacyjnego. Mechanizmami nasilenia stresu oksydacyjnego w komórkach tłumaczy się obecnie patogenezę wielu chorób ludzi i zwierząt (17, 23, 26). W wyniku zmian wartościowości manganu dochodzi do uwolnienia wolnych elektronów, które poprzez jednoelektronową redukcję tlenu prowadzą do powstawania reaktywnych form tlenu, w tym anionodnika ponadtlenkowego, nadtlenu wodoru i rodników hydroksylowych. Związki te cechują się niezwykle silną reaktywnością biochemiczną, dlatego w komórkach znajdują się substancje o działaniu antywołnorodnikowych. Zalicza się do nich antyoksydanty drobnocząsteczkowe oraz enzymy antyoksydacyjne – dysmutazę ponadtlenkową (SOD), katalazę (CAT), a także enzymy związane z glutationem – peroksydazę glutationową (GPx), reduktazę glutationową (GR) oraz S-transferazę glutationową (GST), przy czym ich największą aktywność notuje się w komórkach szczególnie narażonych na rodniki tlenowe – hepatocytach i erytrocytach.

Przewlekłe narażenie na związki manganu prowadzi do objawów zespołu parkinsonoidalnego u ludzi. Jego powstanie związane jest z uszkodzeniem wolnorodnikowym komórek układu pozapiramidowego, a w szczególności układu dopaminergicznego. Pierwsze objawy zatrucia przewlekłego można obserwować już po 3 miesiącach narażenia, jednak najczęściej wystę-

puje on po 2 latach ekspozycji. Do najważniejszych objawów tego zespołu zalicza się zaburzenia neurologiczne związane z uszkodzeniem przede wszystkim układu pozapiramidowego (drżenia kończyn, objaw koła zębatego, ślinotok), jak również układu piramidowego (skurcze miokloniczne, patologiczny odruch Babińskiego) i zmian opuszkowych (zaburzenia połykania, dysartria). Na zmiany te nakładają się objawy psychiatryczne, zwane „szaleństwem manganowym”, na czoło których wysuwa się wzmożenie pobudliwości psychomotorycznej, impulsywność, labilność emocjonalna, wzmożona gadatliwość. Objawy psychiatryczne mogą sugerować, że uszkodzeniu ulegają (oprócz układu piramidowego) ośrodki zlokalizowane w płatach czołowych.

Zjawisko powstawania wolnych rodników w komórkach jest typowe dla wszystkich organizmów oddychających tlenem. W niektórych sytuacjach dochodzi jednak do nasilenia procesów rodnikogenezy. Aby skutecznie im przeciwdziałać, poszczególne elementy ochronnej bariery antyoksydacyjnej muszą tworzyć trwałą i spójny system. Składa się na niego układ enzymatycznych i nieenzymatycznych mechanizmów unieszkodliwiających wolne rodniki.

Peroksydazy glutationowe (GPx) to enzymy zlokalizowane w większości wewnątrz komórek. Najważniejszym substratem GPx jest zredukowany glutation. Kolejnymi mogą być nadtlenek wodoru bądź wodoro-nadtlenek lipidowy (12, 14, 20, 22). S-transferazy glutationowe (GST) to polimorficzna nadrodzina białek enzymatycznych zlokalizowanych zarówno w cytoplazmie, jak i w mikrosomach. Część z nich związana jest z błonami komórkowymi (1, 8, 14, 15, 22). Ich najważniejszą rolą jest udział w drugiej fazie detoksyfikacji ksenobiotyków (9). W przypadku układów antyoksydacyjnych GST uczestniczy w regulacji aktywności GPx oraz może wykazywać aktywność peroksydazową, niezależną od selenu (8, 12). Ponadto GST bierze również udział w detoksyfikacji produktów peroksydacji lipidów, takich jak 4-hydrokso-2,3-nonenal, a poprzez tę właściwość może on pełnić kluczową rolę w podatności na niektóre nowotwory (1, 8, 15). Reduktaza glutationowa (GR) jest enzymem wspomagającym układ antyoksydacyjny poprzez przywracanie redukcji utlenionego glutationu, co umożliwia mu ponowny udział w reakcjach katalizowanych przez GPx i GST. Ma ona również bezpośrednią zdolność usuwania wolnych rodników z komórki (4, 14, 22). Rozmieszczenie enzymów zależnych od glutationu jest nierównomierne. GPx wstępuje praktycznie we wszystkich tkankach, przy czym największą aktywnością tego enzymu cechują się: wątroba, osocze krwi oraz erytrocyty. W ośrodkowym układzie nerwowym aktywność GPx jest nieznacznie mniejsza niż w innych tkankach (5). Zwraca uwagę fakt, że aktywność GPx w istocie szarej jest tylko niewiele wyższa niż w istocie białej. Fakt ten stwierdzono zarówno z mózgach ludzkich, jak i szczurzych (5). GR stwierdza się w wie-

lu tkankach, w tym w tkance mózgowej, jednak jej aktywność w OUN jest niższa niż w nerkach (w przypadku myszy o 32%) czy wątrobie (u myszy o 65%) (9).

Katalazy są białkami enzymatycznymi, w skład których wchodzi m.in. układ porfirynowy i atom żelaza. Cechują się one zarówno aktywnością katalazową, jak i peroksydazową. Występują głównie w komórkach o silnie rozwiniętym metabolizmie tlenowym, takich jak: wątroba, erytrocyty, nerki i OUN (2). W obrębie ośrodkowego układu nerwowego największe, ale porównywalne aktywności stwierdza się w obrębie rdzenia kręgowego oraz mózdzku (2, 6, 30).

Celem badań była próba potwierdzenia neurotoksyczności manganu w oparciu o mechanizmy wolnorodnikowe. Analiza biochemiczna została oparta na ocenie zmian aktywności CAT, GPx, GR i GST.

Materiał i metody

Badania zostały przeprowadzone na samcach szczurów rasy buffalo o masie 250-300 g. Zwierzęta zostały podzielone na trzy grupy, którym podawano w iniekcjach do otrzewnowych przez 2 miesiące, 3 razy w tygodniu, odpowiednio: grupie kontrolnej – roztwór fizjologiczny NaCl, grupie I – roztwór wodny chlorku manganu (II) w dawce odpowiadającej 5 mg/kg m.c. jonów Mn^{2+} , grupie II – roztwór wodny chlorku manganu (II) w dawce odpowiadającej 7,5 mg/kg m.c. jonów Mn^{2+} . Po tym czasie zwierzęta zostały poddane eutanazji, a wypreparowane mózgowia podzielono na półkule mózgowe, pnie mózgowe oraz mózdzki. Ze struktur tych sporządzono homogenaty w buforowanym fosforanami roztworze soli fizjologicznej zawierającej 0,5% detergentu Triton X100. W supernatancie homogenatów oznaczono aktywność CAT, GPx, GR oraz GST (w IU/g białka) oraz stężenie białka (w g/L). Oznaczeń aktywności enzymów dokonano za pomocą zestawów firmy Oxis Int. w temperaturze 37°C, natomiast stężenie białka oznaczono metodą z czerwienią pirogallową (zestaw firmy Randox, Wielka Brytania).

Uzyskane wyniki przedstawiono opierając się na wartościach średnich aktywności poszczególnych enzymów. Zgodność rozkładów zmiennych z rozkładem normalnym sprawdzano testem Szapiro-Wilka. Do porównań między grupami używano testów t-Studenta oraz testu U Manna-Whitneya. Za statystyczne znamienne przyjęto poziomy istotności $p < 0,05$. Do obliczeń wykorzystano program Statistica 7.1.

Wyniki i omówienie

W pniu mózgu zaobserwowano spadki aktywności GPx i GR. W przypadku GPx aktywność w grupie I wynosiła 89,5% aktywności grupy kontrolnej oraz w grupie II 77,8% w stosunku do grupy kontrolnej (kontrola/grupy I, kontrola/grupy II $p < 0,005$). Zaobserwowano również istotny statystycznie ($p < 0,05$) spadek aktywności GPx pomiędzy grupą I a II (do wartości 86,9% w stosunku do grupy I). W przypadku GR zaobserwowano spadek aktywności w stosunku do grupy kontrolnej – do 91,3% w grupie I i 59,5%

Tab. 1. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych (w IU/g białka) w homogenatach pni mózgowych w poszczególnych grupach

	GPx	GR	GST	CAT
Grupa kontrolna	43,78	13,27	102,66	1,31
I	39,20	12,11	100,58	1,43
II	34,08 ^{*,**}	7,89 ^{*,+}	94,09	1,38

Objaśnienia: * $p < 0,005$ między grupą kontrolną a grupą II; ** $p < 0,05$ między grupą I a grupą II; + $p < 0,005$ między grupą I a II

Tab. 2. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych (w IU/g białka) w homogenatach mózdków w poszczególnych grupach

	GPx	GR	GST	CAT
Grupa kontrolna	37,19	11,86	100,17	1,41
I	34,51	11,11	94,79	1,56
II	29,85 [*]	6,06 ^{*,**}	93,97	1,53

Objaśnienia: jak w tab. 1.

Tab. 3. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych (w IU/g białka) w homogenatach półkul mózgowych w poszczególnych grupach

	GPx	GR	GST	CAT
Grupa kontrolna	45,14	26,66	73,54	1,93
I	49,37	24,12	122,22 ⁺	2,37
II	33,77 ^{*,**}	27,27	117,35 ^{**}	1,88

Objaśnienia: * $p < 0,005$ między grupą kontrolną a grupą II; ** $p < 0,05$ między grupą I a grupą II; + $p < 0,0001$ między grupą kontrolną a grupą I; ++ $p < 0,0001$ między grupą kontrolną a grupą II

w grupie II (między kontrolą a grupą I NS, między kontrolą a grupą II $p < 0,005$). Różnice aktywności GR w pniu mózgowym pomiędzy grupą I a II są istotne statystycznie ($p < 0,005$). Nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie w przypadku aktywności GST i CAT w pniach mózgowych.

W homogenatach mózdku stwierdzono spadek aktywności GPx oraz GR. W przypadku GPx zaobserwowano istotny statystycznie (do 80,3%, $p < 0,05$) spadek aktywności pomiędzy grupą kontrolną a grupą II. Nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian aktywności pomiędzy grupą kontrolną a grupą I ani między grupą I a II. W przypadku aktywności GR zaobserwowano spadek aktywności do 93,7% w grupie I (NS) i do 51,1% w grupie II ($p < 0,005$). Istotny statystycznie ($p < 0,05$) spadek aktywności GR zaobserwowano również pomiędzy grupą I a II.

Zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych w półkulach mózgowych dotyczyły GPx oraz GST. W przypadku GR zaobserwowano istotny statystycznie spadek aktywności pomiędzy grupą kontrolną a grupą II (do 74,8%, $p < 0,05$) oraz pomiędzy grupą I a II (do 68,4%, $p < 0,05$). W przypadku GST zaobserwowano bardzo silny wzrost aktywności tego enzymu, zarówno w grupie I (do 166,2%, $p < 0,0001$), jak

i w grupie II (do 159,6%, $p < 0,0001$). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą I a II.

W większości badań oceniających wpływ ekspozycji na czynniki indukujące stres oksydacyjny obserwowany jest wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Indukcja ekspresji tej grupy enzymów, w przypadku ekspozycji przewlekłej, tłumaczona jest zmianami adaptacyjnymi w zakresie mechanizmów obronnych w stosunku do nasilonej rodnikogenezy. W niektórych przypadkach zaobserwowano jednak odwrotne zjawisko, tj. spadek aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Podobny efekt pojawił się w naszych badaniach i dotyczył przede wszystkim GR oraz GPx. Jednak w przypadku półkul mózgowych narażenie przewlekłe na jony manganu doprowadziło do wzrostu aktywności GST (o 66% w grupie I i o 60% w grupie II). Różnica aktywności pomiędzy eksponowanymi grupami jest jednak nieistotna statystycznie, także efekt ten najprawdopodobniej jest niezależny od dawki manganu.

Według danych piśmiennictwa biosyntezę GR pobudzają reaktywne formy tlenu, których stężenie gwałtownie wzrasta w mechanizmie stresu oksydacyjnego. Wg piśmiennictwa, mangan jest pierwiastkiem nasilającym stres oksydacyjny (14), dlatego też pod jego wpływem możemy spodziewać się wzrostu aktywności GR w komórkach. Badania własne wskazują jednak na zjawisko odwrotne. Zaobserwowaliśmy, że przewlekła ekspozycja na jony manganu powoduje obniżenie aktywności GR zarówno w pniach mózgu, jak i mózdku, przy czym zjawisko to wydaje się zależne od dawki. Przy dawce 5 mg/kg m.c. zaobserwowaliśmy spadek aktywności GR o 10% w pniach mózgowych i o 40% w mózdkach, zaś przy dawce 7,5 mg/kg m.c. o 6% w pniach i aż o 49% w mózdkach. Zjawiska takiego nie zaobserwowano w półkulach mózgowych. Podobne zjawisko autorzy zauważyli w przypadku aktywności GR w mięszu wątroby (24). Obniżenie aktywności GR można wytłumaczyć kilkoma mechanizmami, takimi jak: selektywne hamowanie aktywności GR przez jony Mn^{2+} , bezpośredni wpływ tych jonów na proces biosyntezy białka, blokowanie centrum aktywnego GR. W przeprowadzonych przez autorów badaniach *in vitro* układu GR- Mn^{2+} zaobserwowano zjawisko obniżenia aktywności GR w zakresie stężeń 0,5 do 5 $\mu g/ml$ Mn^{2+} (dane niepublikowane).

Podobny efekt redukcji aktywności enzymatycznej zaobserwowano w przypadku GPx, a zjawisko to wydaje się również zależeć od dawki ekspozycyjnej. Większy spadek wystąpił w grupach narażonych na wyższe stężenia manganu. Aktywność GPx w znacznym stopniu zależy od biodostępności selenu. W przypadku niedoboru tego pierwiastka następuje zahamowanie syntezy GPx. Stwierdzono również, że niedobory selenu wpływają na obniżenie aktywności GR, która może wyrażać się m.in. wzrostem wrażliwości

erytrocytów na hemolizę (21). Biorąc pod uwagę te dane można przypuszczać, że jony Mn (II) wpływają hamująco na przyswajanie Se z przewodu pokarmowego – konsekwencją tego byłaby właśnie redukcja aktywności GR i GPx w tkankach mózgowia. Hipoteza ta wymaga jednak weryfikacji w toku dalszych badań.

Niektórzy autorzy podają, że cytotoxycywność manganu związana jest z obniżeniem aktywności CAT, a pośrednio z nasileniem generacji wolnych rodników oraz toksycznych katecholamin, takich jak 6-hydroksydopamina (3, 13, 18). W badaniach własnych nie zaobserwowano wpływu jonów manganu na zmiany aktywności CAT. Była ona stosunkowo niska we wszystkich badanych strukturach mózgowia (od około 1,3 IU/g w pniu mózgowym, poprzez 1,4 IU/g w mózdzku do 1,9 IU/g w półkulach mózgowych). Spadek aktywności CAT zauważono jednak w przypadku innych tkanek (24). Mechanizm tych zmian można tłumaczyć opisywanym w literaturze wpływem jonów Mn^{2+} na gospodarkę żelazem (29). Przewlekła ekspozycja na jony manganu prowadzi zarówno do zmniejszenia wchłaniania żelaza z przewodu pokarmowego, jak i spadku stężenia żelaza w surowicy. Konsekwencją tego może być zmniejszenie biodostępności Fe wykorzystywanego do biosyntezy hemoprotein, np. katalazy i obniżenie aktywności tego enzymu. Brak spadku aktywności CAT w mózgowiu można tłumaczyć wysokosprawnymi mechanizmami homeostazy żelaza w tkance mózgowej.

Istnieją również badania, w których wykazano, iż przewlekła ekspozycja na Mn powoduje zahamowanie aktywności enzymów łańcucha oddechowego (27, 28). Konsekwencją tego może być zmniejszone powstawanie anionorodnika ponadtlenkowego i innych RFT, co stoi w opozycji do teorii oksydacyjnej toksyczności jonów Mn^{2+} .

Uzyskane dane wskazują, że mechanizmy neurotoksyczności manganu są złożone. Niewątpliwie bardzo istotną rolę w tym zjawisku odgrywa stres oksydacyjny, ale nie można wykluczyć bezpośredniego oddziaływania jonów Mn (II) zarówno na procesy biosyntezy białka, jak i na centra aktywne natywnych enzymów. W celu wyjaśnienia tego zjawiska niezbędne staje się przeprowadzenie dodatkowych badań zarówno w układach *in vitro*, jak i *in vivo*.

Piśmiennictwo

1. *Armstrong R. N.*: Structure, catalytic mechanism, and evolution of glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.* 1997, 10, 2-18.
2. *Augustyniak A., Michalak K., Skrzydlewska E.*: Wpływ stresu oksydacyjnego indukowanego etanolem na ośrodkowy układ nerwowy. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2005, 59, 464-471.
3. *Desole M. S., Miele M., Esposito G., Migheli R., Fresu L., De Natale G., Miele E.*: Dopaminergic system activity and cellular defense mechanisms in the striatum and striatal synaptosomes of the rat subchronically exposed to manganese. *Arch. Toxicol.* 1994, 68, 566-570.
4. *Dolphin D., Poulson R., Avramovic O.*: Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects, J. Wiley and Sons. New York 1989.
5. *Dringen R.*: Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog. Neurobiol.* 2000, 62, 649-671.
6. *Eysseric H., Gonthier B., Soubeyran A., Richard M. J., Daveloose D., Barret L.*: Effects of chronic ethanol exposure on acetaldehyd and free radical production by astrocytes in culture. *Alcohol* 2000, 21, 117-125.
7. *Halatek T., Opalska B., Rydzynski K., Bernard A.*: Pulmonary response to methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl treatment in rats: injury and repair evaluation. *Histol. Histopathol.* 2006, 2, 1181-1192.
8. *Hayes J. D., Pulford D. J.*: The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1995, 30, 445-600.
9. *Ho Y. S., Magnenat J. L., Bronson R. T., Cao J., Gargano M., Sugawara M., Funk C. D.*: Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 16644-16651.
10. *Kaiser J.*: Manganese: a high-octane dispute. *Science* 2003, 300, 926-928.
11. *Landrigan P. J.*: MMT, deja vu and national security. *Am. J. Ind. Med.* 2001, 39, 434-435.
12. *Liczmański A. E.*: Toksyczność tlenu. Cz. II. Mechanizmy ochronne. *Post. Biochem.* 1988, 34, 293-310.
13. *Malecki E. A.*: Manganese toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and DNA fragmentation in rat primary striatal neurons. *Brain Res. Bull.* 2001, 55, 225-228.
14. *Pippenger C. E., Browne R. W., Armstrong D.*: Regulatory antioxidant enzymes, [w:] *Armstrong D. (ed.): Free radical and antioxidant protocols. Methods in Molecular Biology.* Humana Press, Totowa, New Jersey 1998, s. 108.
15. *Salinas A. E., Wong M. G.*: Glutathione S-transferases – a review. *Curr. Med. Chem.* 1999, 6, 279-309.
16. *Seńczuk W.*: Toksykologia współczesna. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2005.
17. *Świdarska-Kolacz G., Niemyska K., Witek B., Klusek J., Mierzwa W., Kolać A.*: Influence of testosterone on GSH concentration and glutathione enzyme activity in the liver and kidney of mice. *Medycyna Wet.* 2007, 63, 107-109.
18. *Takeda A.*: Manganese action in brain function. *Brain Res. Rev.* 2003, 41, 79-87.
19. *Truchliński J., Ognik K., Sembratowicz I.*: Influence of prolonged and interrupted stress from crowding and cooling of turkey-hens on anti-oxidation indices of the blood. *Medycyna Wet.* 2007, 63, 95-98.
20. *Ursini F., Maiorino R., Brigelius-Flohe R., Aumann K. D., Roveri A., Schomburg D., Flohe L.*: Diversity of glutathione peroxidases. *Meth. Enzymol.* 1995, 252, 38-53.
21. *Ursini F., Maiorino M., Valente M., Ferri L., Gregolin C.*: Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim. Biophys. Acta.* 1982, 710, 197-211.
22. *Wielkoszyński T., Zawadzki M., Lebek-Ordon A., Olek J., Korzonek-Szlacheta I.*: Enzymatyczne układy antyoksydacyjne – właściwości, występowanie i rola biologiczna. *Diag. Lab. – w druku.*
23. *Yokus B., Bademkiran S., Cakir D. U.*: Total anti-oxidant capacity and oxidative stress in dairy cattle and their associations with dystocia. *Medycyna Wet.* 2007, 63, 167-170.
24. *Zawadzki M., Wielkoszyński T., Januszewska L., Pawlas K., Tyrpień K.*: Wpływ przewlekłej ekspozycji na mangan na aktywność enzymów antyoksydacyjnych związanych z glutationem w wątrobach szczurów. *Ann. Acad. Sil.* 2006, 95, 158-161.
25. *Zayed J.*: Use of MMT in Canadian gasoline: health and environment issues. *Am. J. Ind. Med.* 2001, 39, 426-433.
26. *Zayed J., Guessous A., Lambert J., Carrier G., Philippe S.*: Estimation of annual Mn emissions from MMT source in the Canadian environment and the Mn pollution index in each province. *Sci. Total Environ.* 2003, 312, 147-154.
27. *Zhang S., Fu J., Zhou Z.*: In vitro effect of manganese chloride exposure on reactive oxygen species generation and respiratory chain complexes activities of mitochondria isolated from rat brain. *Tox. In Vitro* 2004, 18, 71-77.
28. *Zhang S., Zhou Z., Fu J.*: Effects of manganese chloride exposure on liver and brain mitochondria function in rats. *Env. Res.* 2003, 93, 149-157.
29. *Zheng W., Zhao Q., Slavkovich V., Aschner M., Graziano J. H.*: Alternation of iron homeostasis following chronic exposure to manganese in rats. *Brain Res. Interactive* 1999, 833, 125-132.
30. *Zimatkin S. M., Lindros K. O.*: Distribution of catalase in rat brain: aminergic neurons as possible targets for ethanol effects. *Alcohol* 1996, 31, 167-174.

Adres autora: lek. med. Marcin Zawadzki, ul. Mikulicza-Radeckiego 7, 50-345 Wrocław; e-mail: zawadzki@hyg.am.wroc.pl