

(137)

Wzrokowe potencjały wywołane (FVEP) po prenatalnym stosowaniu soli metali ciężkich – badania doświadczalne

The visual evoked potentials (FVEP) after the prenatal exposition for heavy metals – experimental studies

Ewa Herba, Dorota Pojda-Wilczek, Stefan M. Pojda, Agata R. Plech, Katarzyna Makowiecka-Obidzińska, Andrzej Plech¹, Ryszard Szkilnik¹, Ryszard Brus¹

Z Katedry i Oddziału Klinicznego Okulistyki Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach
Szpital Specjalistyczny nr 1 w Bytomiu

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Stefan M. Pojda

¹Z Katedry i Zakładu Farmakologii w Zabrze Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Ryszard Brus

Summary: Purpose: To find out, if any and how deep alterations in visual tract are due to prenatal intoxication by heavy metals such as: cadmium (Cd), lead (Pb), mercury (Hg) and manganese (Mn). The measure of these alterations were the changes in flash visual evoked potentials after prenatal intoxication.

Material and methods: The experiments were carried out on 55 white newborns Wistar rats, which were divided into 5 groups: control group (14 rats), Cd group (12), Pb (6), Hg (14) and Mn (9). The method of the FVEP study was described by Pojda et al. (1).

Results: The latencies of the peaks N₁ and P₁ were prolonged in the Mn group till 113-118% (p < 0.05). Slight prolongation of N₁ latencies about 1% in Cd and Hg groups and of 4% in Pb group were not statistically significant. The differences of P₁ latencies were not statistically significant in these groups, compared to the control group. The amplitude of N₁ wave decreased in Cd group about 63% and in Mn group of 32% compared to the control (p < 0.05). In Hg intoxicated group the N₁ amplitude decreased to 56% (p < 0.01). The amplitude of P₁ decreased in all intoxicated groups (Hg of 56%, Cd 55%, Mn 49%) statistically significant, except the Pb one, in which even 21% decrease was not significant.

Conclusions: The heavy metals prolonged the latencies and diminished the amplitudes of flash visual evoked potentials, so may be, they are not only neurotoxic but also „ophthalmotoxic“ factors.

Słowa kluczowe: metale neurotoksyczne, wzrokowe potencjały wywołane, szczury.

Key words: neurotoxic metals, visual evoked potentials, rats.

Metale ciężkie ze względu na zagrożenie dla środowiska biologicznego podzielono na te o bardzo wysokim stopniu potencjalnego zagrożenia, takie jak Cd, Hg i Pb, oraz metale o wysokim stopniu zagrożenia, np. Mn. Szkodliwość biologiczna metali zanieczyszczających środowisko zależy od ich zdolności do łatwej absorpcji drogą oddechową i pokarmową, przenikania przez łożysko (Cd, Hg, Pb), przechodzenia przez barierę krew – mózg (Hg, Pb, Mn), tworzenia połączeń z grupami sulfhydrylowymi białek (Hg, Pb, Cd), wiązania się z DNA i RNA oraz ich uszkodzaniem (Cd, Hg, Mn) (2). Najbardziej znanymi białkami wiążącymi metale są metalotioneiny (MT). Mechanizmy komórkowe neurotoksyczności Mn, Pb, Hg i Cd zostały dokładnie przebadane (3). Mangan wpływa na komórki układu nerwowego poprzez modulowanie wychwyty i uwalnianie

neuroprzebieżników, aktywowanie syntetazy glutaminianowej, zmianę metabolizmu lipidów i białek (4,5). Ołów, kadm, rtęć zmieniają metabolizm wapnia w komórce, blokując kanały i wychwyty tego pierwiastka przez mitochondria. Ołów zmniejsza szczelność bariery krew – mózg poprzez zahamowanie syntezy hemu w mitochondriach, hamuje aktywność Na⁺, K⁺, ATP-azy, katabolizm glukozy i oddychanie komórkowe. Astrocyty chronią neurony przed działaniem nadmiaru Pb, odkładając go w swoich jądrach komórkowych. Zjawisko to nie występuje w młodych astrocytach, co może tłumaczyć większą wrażliwość układu nerwowego młodych zwierząt na Pb (4,6). Neurotoksyczne działanie Hg polega na hamowaniu syntezy białek w niektórych komórkach układu nerwowego. Z innych mechanizmów należy wymienić uszkodzenie błon

komórkowych, indukowanie peroksydacji lipidów, zmiany funkcji kanałów jonowych oraz hamowanie syntezy cholesterolu prowadzące do zmian struktury błon komórkowych (3,4,6). Ryzyko pojawienia się zaburzeń rozwojowych płodu jest największe w przypadku narażenia na Cd. Stężenie Cd w łożysku kobiet ciężarnych jest wielokrotnie większe niż we krwi matki i płodu. W świetle istniejących danych Cd związany w komórce z MT nie działa toksycznie, natomiast wolne jony Cd zaburzają cykle metaboliczne, wywołują rozprężenie fosforylacji oksydacyjnej, hamują oddychanie tkankowe, aktywność enzymów związanych z transportem Na^+ i K^+ oraz zaburzają metabolizm węglowodanów (7). Istotnym problemem jest terato- i kancerogenność metali ciężkich. Ryzyko to, dotyczące omawianych metali, możemy przedstawić następująco: $\text{Hg} > \text{Cd} > \text{Pb}$. Metale ciężkie sprzyjają rozwojowi wielu chorób cywilizacyjnych i powodują, że przebiegają one szybciej. Schorzeniami tymi są: choroby serca, zaburzenia krążenia, miażdżyca, zaburzenia psychiczne (4,6,8,9).

Celem pracy jest ocena czynności bioelektrycznej wzrokowych ośrodków mózgowych wyrażonych wartościami FVEP potomstwa szczurów po prenatalnej intoksykacji ww. metalami.

Materiał i metody

Białe samice szczurze szczepu Wistar o masie ciała około 200-220 g od momentu zapłodnienia do urodzenia otrzymywały do picia wodne roztwory odpowiednio: 50 ppm octanu kadmu $\text{Cd} (\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 250 ppm octanu ołowiu $\text{Pb} (\text{CH}_3 \text{COO})_2 \times 3 \text{H}_2\text{O}$, 50 ppm chlorku rtęci $\text{CH}_3\text{HgCl} \times 2 \text{H}_2\text{O}$ oraz 1000 ppm chlorku manganu $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2$. Samice grupy kontrolnej piły wodę destylowaną. Wszystkie zwierzęta karmione były karmą standardową (Animal Food Works, Motycz, Polska). Doświadczenie przeprowadzono na 55 białych, potomnych szczurach zrodzonych z powyższych samic, obu płci, w 3.-6. miesiącu życia. Średnia masa ciała potomnych samic wynosiła 290 g, samców – 350 g. Utworzono 5 grup badanych, obejmujących: 12 szczurów prenatalnie ekspozowanych na Cd (grupa kadmowa), 6 na Pb (grupa ołowiowa), 14 na Hg (grupa rtęciowa), 9 na Mn (grupa manganowa). Czternaście zwierząt z czystej hodowli stanowiło grupę kontrolną. Zwierzęta potomne dobierano w taki sposób do doświadczeń, by w poszczególnych grupach samców i samic znajdowały się szczury pochodzące z kilku miotów.

Siedem dni przed doświadczeniem szczury znieczulano tiopentalem (Thiopental, Un. Pharm. Works, Praha, Czechy, 40 mg/ kg i.p.). Po umieszczeniu w aparacie stereotaksyjnym (COTM Białystok) nacinano zwierzęciu skórę głowy i odsłaniano kości pokrywy czaszki. Zakładano elektrodę czynną pod pokrywą czaszki na oponę twardą w okolicy kory wzrokowej oraz elektrodę bierną na kość pokrywy czaszki w okolicy międzyczołowej. Elektrody wykonano z igieł do wstrzykiwań śródskórnych wielorazowego użytku (Record, MIFAM – Polska). Po upływie 7 dni zwierzęta ponownie znieczulano wodzianem chlorału podanym dootrzewnowo (i. P.) w dawce 30 mg/ 100 g masy ciała szczura według metody opracowanej i opisaną przez S. Pojdy i A. Plecha w 1993 r. (1) i podłączano do aparatu elektrofizjologicznego LKC – System (USA), pracującego według programu EPIC 1000. Źrenice rozszerzano za pomocą kropli 1% tropicamidu (Tropicamidum, POLFA Warszawa, Polska) i 1% roztworu atropiny (Atropinum sulfuricum, POLFA Warszawa, Polska). Powieki trwale rozwierano za pomocą pojedynczych szwów założonych na ich brzegi. Pomiarów FVEP dokonywano przez 30 minut po wcześniejszym okresie adaptacji do warunków badania, trwającym oko-

ło 20-30 min. Szczura drażniono co 5 minut 150 błyskami światła o częstotliwości 1,9 Hz. W ten sposób w przypadku każdego zwierzęcia uzyskano po 6 wartości FVEP. Sygnały przechodziły kolejno przez filtry niskiej i wysokiej częstotliwości (0,3 i 100 Hz). Zapisy odpowiedzi były za każdym razem uśredniane komputerowo i zapisywane. Ocenie poddano latencje i amplitudy pierwszego ujemnego załamka N_1 oraz występującego po nim pozytywnego P_1 krzywej FVEP w stosunku do linii izoelektrycznej. Wyniki poddano analizie statystycznej za pomocą testu t-Studenta. Poziom istotności wyników przyjęto dla $p < 0,05$.

Badania wykonano zgodnie ze standardami badań doświadczalnych. Uzyskano zgodę lokalnej komisji etycznej na ich przeprowadzenie.

Wyniki

W tabeli I przedstawiono wyniki badań.

Latencja FVEP

Latencje obu załamek N_1 i P_1 w grupie Mn uległy statystycznie znamienneму wydłużeniu, N_1 o 18% (59 ms \pm 2,7), P_1 o 13% (80 ms \pm 0,5). W pozostałych badanych grupach uzyskano nieznaczne wydłużenie latencji załamka N_1 w stosunku do kontroli: w grupie kadmowej o 1% (50,7 ms \pm 0,8), rtęciowej o 1% (50,6 ms \pm 1,3), a ołowiowej o 4% (52 ms \pm 2,4). Podobne wartości wydłużenia latencji uzyskano w poszczególnych grupach badanych dla załamka P_1 : w grupie kadmowej o 2% (71,4 ms \pm 1,6), rtęciowej o 1% (72 \pm 1,7), a ołowiowej o 4% (74 ms \pm 2,4). Powyższe wyniki są statystycznie nieznamienne.

Amplituda FVEP

Wartość amplitudy załamka N_1 uległa statystycznie znamienneму obniżeniu w stosunku do kontroli (47 μV) w grupie Cd o 63% (17,6 $\mu\text{V} \pm$ 2,8), Hg o 44% (26,36 $\mu\text{V} \pm$ 3,5) oraz Mn o 32% (32 $\mu\text{V} \pm$ 3,8). Wartość amplitudy załamka N_1 wzrosła o 4% (49 $\mu\text{V} \pm$ 10,5) w grupie Pb. W grupie kontrolnej amplituda załamka P_1 wynosiła 28 μV . W grupie Cd obniżyła się o 55% (12,6 $\mu\text{V} \pm$ 3,2), Hg o 56% (12,4 $\mu\text{V} \pm$ 4,2), a Mn o 39% (17 $\mu\text{V} \pm$ 3,8). Uzyskane wartości charakteryzuje wysoka zmienność statystyczna ($p < 0,01-0,05$). W grupie Pb pomimo obniżenia amplitudy P_1 o 21% (22 $\mu\text{V} \pm$ 18,4) w stosunku do kontroli nie było statystycznej istotności.

Omówienie

Wpływ metali ciężkich na narząd wzroku jest tematem rzadko opisywanym. W dostępnej literaturze spotykamy opisy testów behawioralnych w modelu doświadczalnym. Wszystkie badane przez nas metale spowodowały zmiany w zapisie FVEP charakterystyczne dla toksycznego uszkodzenia drogi wzrokowej. Ikedo i wsp. badali wzrokowe potencjały wywołane błyskami u nałogowych palaczy (u nich stwierdza się przekroczenie dopuszczalnych stężeń kadmu w organizmie), u których wystąpiło toksyczne niedowidzenie. Wykazali obniżenie wartości amplitudy P_{100} z 10,3 μV do 2,5 μV oraz wydłużenie czasu latencji do 118 ms. Autorzy sugerują, że Cd może mieć większy wpływ na czynności enzymatyczne i transportowe komórek przekaźnikowych i aksonów niż na osłonki mielinowe włókien nerwu II (10). Yargicoglu i wsp. badali, jaki wpływ na wzrokowe potencjały wywołane błyskami ma kadm (w stężeniu 15 ppm) podawany tylko w okresie prenatalnym oraz łącznie w okresie prenatalnym i w czasie 60 dni po urodzeniu białym szczurom szwajcarskim. Zanotowano wydłużenie średnich wartości latencji N_1 (52,06 msec. \pm 7,93) i P_1 (70,13 msec. \pm 9,46) w stosunku do

	Latencja N ₁ (ms)	Latencja P ₁ (ms)	Amplituda N ₁ (μ V)	Amplituda P ₁ (μ V)
grupa kontrolna control group n = 84	50 ms \pm 0,5	71 ms \pm 0,2	47 μ V \pm 1,1	28 μ V \pm 1,5
grupa zwierząt po ekspozycji na Cd prenatal animal group exposed for Cd n = 72	50,7 ms \pm 0,8	71,4 ms \pm 1,6	17,6 μ V \pm 2,8 **	12,6 μ V \pm 3,2 **
grupa zwierząt po ekspozycji na Hg prenatal animal group exposed for Hg n = 84	50,6 ms \pm 1,3	72 ms \pm 1,7	26,3 μ V \pm 3,5 **	12,4 μ V \pm 4,2 **
grupa zwierząt po ekspozycji na Mn prenatal animal group exposed for Mn n = 54	59 ms \pm 2,7 *	80 ms \pm 0,5 *	32 μ V \pm 3,8 *	17 μ V \pm 3,8 *
grupa zwierząt po ekspozycji na Pb prenatal animal group exposed for Pb n = 36	52 ms \pm 1,5	74 ms \pm 2,4	49 μ V \pm 10,5	22 μ V \pm 18,4
n – sumaryczna liczba oznaczeń FVEP w grupie n – the total numer of recordings of FVEP in group *p < 0,05 w stosunku do kontroli *p < 0.05 vs. control **p < 0,01 w stosunku do kontroli **p < 0.01 vs. control				

Tab. I. Średnie wartości (z odchyleniem standardowym) latencji oraz amplitudy załamków N₁ i P₁ krzywej FVEP w grupie zwierząt po prenatalnej ekspozycji na Cd, Hg, Mn, Pb oraz w grupie kontrolnej.

Tab. I. The mean values (with mean deviation) of the latencies and amplitudes of N₁ and P₁ peaks of FVEP curve in prenatal animal group exposed for Cd, Hg, Mn, Pb and in the control one.

kontroli, odpowiednio (45,43 msek. \pm 2,69 i 62,06 msek. \pm 4,04). Amplituda Δ N₁ P₁ w obu grupach szczurów otrzymujących kadm uległa znamiennej obniżeniu (7,89 μ V \pm 4,45) w stosunku do grupy kontrolnej (12,58 μ V \pm 4,29). Autorzy zwracają uwagę na wydłużenie latencji wszystkich załamków krzywej elektrofizjologicznej, co ma być potwierdzeniem neurotoksycznego wpływu kadmu na całą drogę wzrokową. Ponadto stwierdzają, że większe stężenie kadmu w mózgu i tym samym większe zmiany w badaniu FVEP uzyskano w grupie szczurów, którym podawano Cd w okresie pre- i postnatalnym (11).

Uzyskane przez nas wyniki wpływu kadmu na wydłużenie latencji i obniżenie amplitudy załamków N₁ i P₁ są zgodne z podanymi przez Yargicoglu. Spośród badanych metali największe zmiany otrzymaliśmy w grupie Cd. Na podstawie otrzymanych wyników możemy uszeregować badane metale pod wpływem wielkości uszkodzenia FVEP następująco: Cd > Hg > Mn > Pb. Otrzymane wyniki pozwalają ocenić wpływ powyższych metali na funkcję nerwu wzrokowego i drogi wzrokowej. Nie możemy wnioskować o ich wpływie na siatkówkę. Ekspozycja w życiu płodowym na Pb spowodowała u badanych szczurów zmiany w FVEP, które nie wykazywały statystycznej znamienności. W grupie Pb otrzymaliśmy duże różnice pomiędzy wynikami, poza tym była to najmniej liczna grupa szczurów. Ponadto stosowana przez nas dawka 250 ppm (odpowiadająca narażeniu środowiskowemu w rejonach hut ołowiu) jest dawką niską. Trwałe wydłużenie latencji FVEP po ekspozycji na ołów opisali Lilienthal i wsp. u małych eksponowanych w życiu płodowym i do 9 lat po urodzeniu oraz Fox i wsp. u szczurów eksponowanych na

ołów w okresie noworodkowym, lecz stosowane przez tych autorów dawki były dziesięciokrotnie wyższe (12,13).

Wniosek

Wszystkie badane metale spowodowały zmiany w zapisie FVEP charakterystyczne dla toksycznego uszkodzenia drogi wzrokowej. Uzyskane rezultaty dowodzą niekorzystnego wpływu soli badanych metali na czynność bioelektryczną narządu wzroku.

PIŚMIENNICTWO:

- Pojda S. M., Plech A.: *Wzbudzone potencjały wzrokowe (VER) czuwających szczurów oznaczone za pomocą zmodyfikowanej komputerowej metody klinicznej*. Ann. Acad. Med. Sil., Katowice, 1993; suppl. 11: 73-78.
- Kabata-Pendias A., Pendias H.: *Pierwiastki śladowe w środowisku biologicznym*. Wydawnictwa Geologiczne, Warszawa, 1979.
- Clarkson T. W.: *Metal toxicity in the central nervous system*. Environ. Health Perspect., 1987; 75: 59-64.
- Małecki A.: *Wpływ metali ciężkich zawartych w pyłe węglowym na organizmy zwierząt*. Praca doktorska, ŚAM, Katowice, 1994.
- Tholey G., Megias-Megias L., Wedler F. C., Ledig M.: *Modulation of Mn accumulation in cultured rat neuronal and astroglial cells*. Neurochem. Res., 1990; 15: 751-754.
- Elinder C. G.: *Biological monitoring of toxic metals – overview*. Clarkson T. W., Friberg L., Nordberg G. F., Sager P. R., Plenum Press, Nowy Jork – Londyn, 1988, 1-71.

7. Seńczuk W.: *Toksykologia*. Warszawa, PZWL, wyd. II, 1994, 321-328.
8. Donaldson J.: *The physiopathologic significance of manganese in brain: its relation to schizophrenia and neurodegenerative disorders*. NeuroToxicol., 1987; 8: 451-462.
9. Tilson H. A.: *Symposium on neurotoxicology of heavy metals*. I. Fundam. Appl. Toxicol., 1987; 9: 599-607.
10. Ikeda H., Tremain K. E., Sanders M. D.: *Neurophysiological investigation in optic nerve disease: combined assessment of the visual evoked response and electroretinogram*. B. J. Ophthalmol., 1978; 62: 227-239.
11. Yargicoglu P., Agar A., Oguz Y., Izgut-Uysal V. N., Senturk U. K., Oner G.: *The effects of development exposure to cadmium on visual evoked potentials and lipid peroxidation*. Neurotoxicol. and Teratol., 1997; 19: 213-219.
12. Lilienthal H., Lenaerts C., Winneke G., Hennekes R.: *Alteration of the visual evoked potential and the electroretinogram in lead treated monkeys*. Neurotoxicol. Teratol., 1988; 10: 417-422.
13. Fox D., Lewkowski J., Cooper G.: *Acute and chronic effects of neonatal lead exposure on the development of the visual evoked response in rats*. Toxicol. Appl. Pharmacol., 1977; 40: 449-461.

Praca wpłynęła do Redakcji 14.10.2005 r. (781).

Zakwalifikowano do druku 14.10.2005 r.

X Jubileuszowe Sympozjum Sekcji Zapobiegania Ślepotcie i Rehabilitacji Słabowidzących PTO, Warszawa, 5-6 listopada 2004 r.

Adres do korespondencji (Reprint requests to):

dr n. med. Ewa Herba

ul. Żeromskiego 7

41-902 Bytom

PLAN WYDAWNICZY NA 2006 ROK

Kwartalnik medyczny OKULISTYKA



- Nr 1 (I) Postępy w chirurgii witreoretinalnej
– opieka merytoryczna prof. Andrzej Stankiewicz.
- Nr 1 (II) Alergologia (w związku z III Sympozjum Sekcji Alergologii PTO, Łódź)
– opieka merytoryczna prof. Janusz Czajkowski.
- Nr 2 (I) Chirurgia refrakcyjna
– opieka merytoryczna prof. Jerzy Szaflik.
- Nr 2 (II) Jaskra – chirurgia (w związku z sympozjum jaskry PTO, Wrocław)
– opieka merytoryczna prof. Janusz Czajkowski.
- Nr 3 Diagnostyka i powikłania w leczeniu chorób oczu
– opieka merytoryczna prof. Józef Kałużny.
- Nr 4 Postępy w onkologii okulistycznej
– opieka merytoryczna prof. Dariusz Kęcik.

KONTAKTOLOGIA I OPTYKA OKULISTYCZNA (dwa wydania)



- Nr 1. Pierwsze półrocze 2006 roku
(w związku ze spotkaniem szkoleniowym Sekcji Kontaktologicznej PTO, Warszawa).
- Nr 2. Drugie półrocze 2006 r.