

IL MANGANESE: DISTRIBUZIONE TISSUTALE A SEGUITO DELLA SOMMINISTRAZIONE CRONICA NEL CONIGLIO

THE MANGANESE: TISSUE DISTRIBUTION AFTER CHRONIC ADMINISTRATION IN THE RABBIT

G. Delbono¹, A. Fusari¹, A. Ubaldi¹, R. Duratti

IL MANGANESE

Caratteristiche chimico-fisiche

Il manganese, elemento del gruppo VIIA del sistema periodico, ha proprietà per molti aspetti simili a quelle del ferro, immediatamente preceduto nella prima serie di transizione. Il manganese, tuttavia, è più duro, più fragile e meno refrattario del ferro. L'elemento ha una densità di 7,3 g/cm³, una temperatura di fusione di 1244 °C ed una temperatura di ebollizione di 1962°C¹. Il manganese puro è di colore argenteo, ma non si trova in natura. Il manganese metallico è ferromagnetico soltanto dopo uno speciale trattamento.

Questo metallo è chimicamente reattivo e si dissolve rapidamente in acidi diluiti non ossidanti; nel cloro si incendia per formare MnCl₂; reagisce con l'ossigeno ad alta temperatura, producendo Mn₃O₄; si combina anche direttamente con B, C, S, Si e P².

Il manganese ha numerosi stati di ossidazione, il più importante dei quali, sotto l'aspetto pratico, è quello bivalente. Mn(II) forma una serie di sali manganosi con tutti i più comuni anioni, quasi tutti solubili e cristallizzabili come idrati; Mn(II) forma anche una serie di chelati con EDTA ed altri agenti. La chimica di Mn(III) non è molto vasta, perché in soluzione acquosa Mn(III) è instabile e viene rapidamente ridotto a Mn(II). Allo stesso modo i composti Mn(IV) sono di limitata importanza pratica, ad eccezione di MnO₂. Mn(VI) si trova soltanto nello ione manganato (MnO₂)⁻. I permanganati, che sono forti agenti ossidanti, hanno valenza +7.

Diffusione ambientale

Il manganese è relativamente abbondante (costituisce intorno allo 0.1 % della litosfera) ed è il dodicesimo elemento più comune. Tra i metalli pesanti è secondo soltanto al ferro.

Il manganese in natura si trova combinato con borati, carbonati, fosfati, ossidi, silicati e solfuri.

Il minerale contenente manganese più importante è la pirolusite (MnO₂); altri minerali sono i rodanati e la rodocrosite². Le miniere si trovano in depositi sotterra-

¹ Sezione di Diagnostica e Tossicologia Sperimentale - Dipartimento di Salute Animale - Università di Parma

nei o all'aperto. I maggiori giacimenti sono in Australia, Brasile, Gabon, Sud-Africa, Russia, India e Messico. Ci sono grandi riserve di manganese nelle profondità oceaniche in forma di noduli polimetallici, attualmente considerate non utilizzabili, perché di recupero dispendioso e difficile.

Il manganese è presente in tutti i tessuti animali e vegetali, nell'acqua e nel pulviscolo atmosferico.

Nelle aree urbane e rurali senza sorgenti puntiformi, i livelli di fondo dell'elemento nell'aria vanno da 0,01 a 0,07 mg/m³, mentre nelle aree con sorgenti di emissione industriale i livelli vanno da 0,22 a 0,3 mg/m³. Le sorgenti antropogeniche di manganese nell'ambiente aereo sono costituite dalla combustione dei combustibili fossili (20%) e dall'emissione gassosa industriale (80%). L'utilizzo dei composti organometallici nella produzione di benzine può provocare un incremento delle concentrazioni di manganese nell'ambiente aereo delle aree urbane. L'erosione del suolo è un'altra importante sorgente di manganese nell'aria, ma i dati disponibili per stimare questo contributo sono scarsi.

Le concentrazioni medie di manganese nell'acqua di mare sono di 2 mg/L, mentre nell'acqua dolce vanno da 1 a 200 mg/L. Alcuni composti, come il cloruro ed il solfato di manganese, sono solubili in acqua e quindi l'esposizione può avvenire attraverso l'ingestione di acqua contaminata.

Utilizzi produttivi

Il manganese è stato proposto come elemento da Sheele nel 1771, ma è stato scoperto da Gahn, un chimico svedese che nel 1774 lo ottenne per riduzione della pirolusite tramite carbone. I suoi utilizzi, però, sono rintracciabili nel Periodo del Paleolitico, quando il biossido di manganese era impiegato come pigmento nelle pitture delle caverne. Più tardi, nell'Antica Grecia, la presenza di manganese nei minerali ferrosi usati dagli Spartani è la più plausibile spiegazione del fatto che le loro produzioni metalliche fossero superiori a quelle dei Troiani. Gli Egizi ed i Romani utilizzavano i minerali del manganese nella produzione del vetro, sia per la decolorazione sia per la colorazione (rosa, porpora o nera). Il nome del metallo deriva dal latino "magnes", e proviene dalle proprietà magnetiche della pirolusite³.

Nella metà del XVII secolo, il chimico Glauber ottenne il permanganato, il primo sale di manganese utilizzato. Un secolo dopo, gli ossidi di manganese divennero la base per la produzione del cloro.

Agli inizi del XIX secolo gli scienziati inglesi e francesi considerarono l'uso del manganese nella produzione degli acciai: l'aggiunta dell'elemento incrementava la durezza del ferro senza ridurne la malleabilità o la resistenza. Le leghe Mn-Fe, attualmente il principale impiego produttivo del metallo, sono prodotte attraverso il riscaldamento oltre i 1200°C dei minerali in altiforni od in fornaci elettriche. Un'altra produzione importante, iniziata nei primi del 1900, è la lega Mn-Si, utilizzata per la produzione di acciaio inossidabile. La riduzione del contenuto di carbonio, come richiesto dall'industria degli acciai, si ottenne inizialmente con un processo alluminotermico. Intorno al 1840 in Inghilterra si iniziò a produrre il manganese metallico attraverso un processo elettrolitico. Negli anni '60 si riusciva a produrre su scala commerciale manganese elettrotermico con una purezza fino al 98%.

Il manganese viene utilizzato in piccole quantità nella produzione di leghe di alluminio, rame, zinco, magnesio per incrementarne alcune proprietà.

Il secondo settore utilizzatore di manganese è attualmente quello della produzione di batterie. Nel 1868 Leclanché sviluppò le batterie a secco, tramite l'utilizzo del biossido di manganese come depolarizzante.

La storia del manganese nel XX secolo è costituita da una miriade di nuove applicazioni nei più svariati settori.

I composti del manganese si formano da reazioni con Mn metallico o con i minerali che contengono l'elemento. Il cloruro di manganese trova impiego nella produzione di accumulatori elettrici, di integratori per mangimi zootecnici, di catalizzatori per la clorazione di sostanze organiche e di precursori per altri composti del manganese¹. Il biossido di manganese trova impiego, oltre che nella produzione di accumulatori elettrici, nella produzione del vetro e dei fuochi d'artificio. Il solfato di manganese viene usato nella produzione di ceramiche, nonché di integratori per mangimi zootecnici e di fertilizzanti.

L'ossidazione elettrolitica di MnO_2 in KOH produce il permanganato di potassio che, per le sue proprietà ossidanti, battericide e algicide, trova impiego nella produzione di disinfettanti per l'acqua o gli impianti, di pulitori per metalli e di agenti conservativi per fiori e frutti.

Il manganese in varie forme viene anche impiegato nella produzione di pigmenti e vernici nere, circuiti elettronici, preparazioni industriali e farmaceutiche.

I composti organici del manganese si utilizzano nella produzione di fungicidi, additivi per benzina con e senza piombo, combustibili in genere e abbattitori di fumo. Alcuni fungicidi della famiglia dei ditiocarbammati, come Maneb e Mancozeb, contengono l'elemento e sono molto utilizzati per il controllo di avversità della vite, dei cereali e delle piante da frutto in genere.

Il metilciclopentadienil-tricarbonil-manganese (MMT) è stato introdotto negli ultimi anni come sostituto del piombo, con funzione antidetonante nell'additivazione della benzina. La combustione della benzina contenente l'additivo rilascia particelle submicroscopiche di Mn_3O_4 , potenzialmente inalabili¹. In Canada il MMT è un additivo del carburante già dal 1976. Sebbene l'uso del MMT faccia diminuire il rilascio di monossido di carbonio, l'EPA negli Stati Uniti aveva in origine bandito il composto perché incrementava le emissioni di idrocarburi dalle marmitte catalitiche. Nel 1995 la Corte Federale USA ha deciso di autorizzare l'uso del MMT, attualmente impiegato anche in Europa.

La domanda mondiale di manganese dipende, comunque, direttamente dalle richieste dell'industria dell'acciaio mentre le altre applicazioni produttive non influenzano significativamente la domanda complessiva.

Diffusione negli alimenti

Fino a tempi recenti, le informazioni disponibili sul contenuto di manganese dei diversi alimenti e sull'assunzione da parte delle varie categorie della popolazione erano scarse. La situazione è cambiata con il miglioramento delle tecniche analitiche e con l'acquisizione delle conoscenze sul significato che ha l'elemento per la salute⁴.

Analisi effettuate in numerosi paesi mostrano come i livelli del metallo nelle stes-

se categorie di alimenti sono abbastanza simili. Le concentrazioni nei diversi tipi di alimenti, invece, mostrano grandi variazioni: i valori più elevati di manganese si trovano nei prodotti vegetali, specialmente nei cereali integrali, mentre i valori più bassi si trovano nei prodotti di origine animale⁵. Il tè può costituire la maggior fonte di manganese nella dieta ed è probabile che in una dieta in cui non sono presenti tè e cereali interi ci sia una bassa assunzione di manganese². I processi di raffinazione industriale dei cereali provocano nei prodotti derivati una considerevole perdita dell'elemento².

L'assunzione media giornaliera è approssimativamente di 2-6 mg di Mn e può arrivare a 11 mg nelle diete vegetariane. Il contributo dell'acqua potabile sull'assunzione totale di manganese, se comparata a quella della dieta, è basso. Tenuto conto della composizione media della dieta della popolazione italiana e considerati i livelli nei vari alimenti, i maggiori contributi provengono dai cereali e derivati (specialmente integrali), dal vino e dal tè⁶.

In mancanza di dati precisi sul fabbisogno, in Italia non ci sono livelli di assunzione raccomandati (L.A.R.N.), ma le autorità sanitarie consigliano per il manganese intervalli di sicurezza e adeguatezza di 1-10 mg/gg⁶, in accordo con le raccomandazioni europee⁷. Negli Stati Uniti, i livelli accettabili di manganese stabiliti dalle autorità sanitarie sono di 2.5-3 mg/gg per gli adulti, 1-1,5 mg/gg per gli adolescenti e 1 mg/gg per i bambini. Negli ultimi anni il dibattito riguardante il manganese è stato focalizzato sul potenziale pericolo rappresentato dalle formulazioni a base di soia per i neonati, che hanno livelli di manganese più elevati rispetto a quelli del latte materno.

Diffusione nell'organismo e ruolo biologico

Il manganese si è rivelato elemento essenziale in ogni specie animale studiata. Il contenuto totale di manganese nell'organismo umano varia da 12 a 20 mg⁶.

L'elemento è noto come attivatore di diversi enzimi *in vitro* e costituisce numerosi enzimi (arginasi, piruvato carbossilasi, glutamina sintetasi e superossido dismutasi mitocondriale). Il manganese, inoltre, è essenziale per la formazione dell'osso e della cartilagine². Il manganese può essere essenziale per l'utilizzazione della vit. B₁, della vit. E e del ferro.

Non sono stati accertati con sicurezza casi di carenza di manganese nell'uomo⁶. Nell'animale, in seguito a carenza indotta sperimentalmente, si evidenziano rallentamento della crescita, deformità scheletriche, diminuzione della capacità riproduttiva e difetti nel metabolismo di carboidrati e lipidi.

Gli animali che pascolano sembra non soffrano della carenza di manganese, perché le loro richieste sono soddisfatte dai foraggi che consumano. La deficienza di manganese può essere un problema serio per le specie avicole, per i bovini che non pascolano e per i suini, poiché i supplementi proteici, spesso di origine animale, sono solitamente poveri dell'elemento. Per promuovere la crescita i mangimi specifici per avicoli hanno concentrazioni di manganese intorno a 40 mg/kg, mentre quelli per i ruminanti hanno livelli di 15-25 mg/kg.

Nell'uomo l'assorbimento intestinale del manganese è scarsamente efficiente (5-10%), con considerevoli variazioni tra gli individui. L'assorbimento è inoltre influen-

zato negativamente dalla presenza di alcuni metalli, come ferro e cobalto e dall'elevato contenuto di calcio, fosforo e fitati presenti negli alimenti⁴.

Il manganese, dopo essere entrato nel circolo sanguigno, viene in gran parte captato dal fegato. L'escrezione avviene quasi esclusivamente per via biliare, ma con un circolo entero-epatico che ne limita l'eliminazione. L'elemento viene concentrato, quindi, nel fegato ed anche nel rene e nel pancreas, organi ricchi di mitocondri. I tessuti ricchi di cheratina possono accumulare manganese ed è stato proposto che i capelli ed il pelo possano riflettere lo stato dell'elemento nell'organismo. Le strutture pigmentate come la retina, la pelle scura ed i granuli di melanina contengono alti livelli di manganese. Le ossa sono abbastanza ricche di manganese ed a causa della loro massa contengono la percentuale dell'elemento più elevata del corpo (nell'uomo il 25% del contenuto totale).

Il feto non accumula riserve di manganese prima della nascita e le concentrazioni tissutali fetali sono molto basse⁸.

Tossicità

A dispetto della sua essenzialità, l'eccessiva esposizione al manganese provoca fenomeni di tossicità al sistema nervoso centrale^{9,10}.

Le prime notizie su anomalie neurologiche associate all'esposizione al manganese risalgono al 1837. In una miniera in Francia cinque lavoratori manifestarono ipotonia muscolare, tremori, postura ricurva durante la deambulazione, parlata mormorante e salivazione. In seguito, nei primi del XX secolo sono stati riportati sintomi simili nel cosiddetto "manganese crusher's disease"³. Da allora sono state realizzate numerose ricerche relative all'esposizione professionale dei lavoratori delle miniere, delle acciaierie, delle industrie delle batterie e delle industrie chimiche che utilizzano il metallo.

L'intossicazione acuta per inalazione delle polveri di manganese porta nell'immediato alla cosiddetta "febbre da vapore metallico", caratterizzata da dolori muscolari, brividi, secchezza della gola e della bocca. I sintomi sono preceduti da bronchite acuta, nasofaringite, polmonite ed intorpidimento delle estremità¹¹. Il manganese, poi, dai polmoni trasferisce i suoi effetti devastanti al cervello. L'intossicazione può portare a manifestazioni acute psichiche e neurologiche, che nel complesso prendono il nome di "manganismo". Tali sintomi sono molto simili a quelli del morbo di Parkinson (difficoltà nel cammino e nel controllo preciso dei movimenti della mano), causati da degenerazione cerebrale e distruzione della funzione nervosa in alcune aree¹². Se l'intossicazione non viene scoperta in tempo i sintomi possono esacerbarsi e diventare irreversibili.

Possono essere esposti ad un eccesso di manganese anche gli operatori agricoli che utilizzano impropriamente i formulati contenenti le sostanze attive a base di manganese.

Ricerche epidemiologiche ed esperimenti *in vitro* suggeriscono che gli effetti tossici possono verificarsi con esposizioni a concentrazioni di Mn molto basse⁹.

Fino a tempi recenti si credeva che, mentre i vapori e le polveri del metallo potessero provocare tossicità, l'ingestione di manganese con il cibo non provocasse danni. La comune opinione che il manganese negli alimenti non sia potenzialmente tossico

per l'uomo, è stata messa in discussione dalle ricerche di alcuni autori negli anni '80, attraverso l'osservazione di disordini neurologici sofferti dagli abitanti di un'isola a Nord dell'Australia. Questa popolazione viveva in prossimità di miniere a cielo aperto, tra enormi cumuli di minerali di manganese ed è stato stimato che la dieta conteneva 100-200 mg/kg di manganese. Il 2% degli aborigeni si presentavano affetti da difetti motori neurali e da disfunzioni cerebrali. Un sintomo distintivo della condizione era l'andatura veloce e goffa. La causa della malattia era verosimilmente dovuta ad una predisposizione genetica in alcuni individui suscettibili, stimolata da alti livelli ambientali di manganese. L'intossicazione cronica, in quel caso, è probabilmente avvenuta sia per l'elevata assunzione con il cibo e l'acqua sia per l'inalazione di polveri².

L'esposizione alle polveri ed ai fumi di manganese non dovrebbe superare il valore guida di 5 mg/m³, anche per brevi periodi. L'industria del manganese ha adottato specifiche misure di protezione per i lavoratori, come la riduzione dei livelli e dei tempi di esposizione, l'impiego della ventilazione e l'uso di equipaggiamenti protettivi. Molti paesi hanno portato restrizioni sulle quantità permesse di manganese nell'ambiente aereo e queste misure nel futuro si rafforzeranno. Tuttavia, attraverso test neurologici condotti su lavoratori esposti è stato constatato che esposizioni continue a concentrazioni di manganese pari a 1 mg/m³ di aria sono sufficienti ad influire sul SNC¹³. Il sovraccarico di manganese, infatti, causa lesioni ai gangli basali con abbassamento dei livelli di dopamina³.

Quindi, anche se la maggior parte dei casi di tossicità cronica è legata all'inalazione di particolato contenente manganese, gli effetti sul SNC si hanno anche con l'esposizione al manganese attraverso altre vie. E' stata osservata tossicità in popolazioni che bevevano acqua contenente naturalmente concentrazioni elevate di manganese¹⁴. La tossicità è stata anche evidenziata in individui che ricevevano alimentazione per via intravenosa.

L'intossicazione cronica nell'uomo per ingestione può causare cefalea, agitazione, irritabilità, disturbi della personalità, allucinazioni, sordità, rigidità e tremori¹⁵.

Ricerche recenti hanno suggerito che i bambini sotto i due anni non dovrebbero assumere un'eccessiva quantità di manganese nella dieta, specialmente quella derivante dalle formulazioni per l'infanzia ricche di soia, perché ciò può incrementare il rischio di interferenza con la biochimica del cervello, portando ad effetti tossici¹⁶.

L'eccesso di manganese nella dieta interferisce con l'assorbimento del calcio e del ferro. Negli animali domestici, così come nelle sperimentazioni animali, l'effetto più comune della tossicità da manganese è la carenza secondaria di ferro; ciò è dovuto ad una competizione tra Fe e Mn per comuni sistemi di trasporto e complessati. La tossicità acuta porta negli animali a crescita stentata, anoressia, alterazioni del metabolismo dei carboidrati, alterazioni delle funzioni cerebrali e anomalie comportamentali. Alti livelli di manganese nella dieta non sembrano essere teratogeni, sebbene il manganese iniettato sia fetotoossico in numerose specie, come gatto, topo, coniglio e suino.

Nelle sperimentazioni sui ratti la tossicità cronica porta a disturbi del comportamento, come riduzione delle abilità legate all'apprendimento ed un aumento delle attività spontanee¹⁷.

La determinazione delle concentrazioni di manganese nel siero, realizzata conte-

stualmente all'elaborazione delle immagini di risonanza magnetica del cervello, eventualmente associata a test neurofunzionali, sembra rappresentare il miglior supporto diagnostico per monitorare l'eccessiva esposizione al manganese¹².

Secondo alcuni autori l'accertamento del rischio attraverso gli esperimenti sugli animali od attraverso le osservazioni epidemiologiche non da molte informazioni. La principale questione per la quantificazione di tale rischio è stata, e continuerà ad essere, la relazione tra concentrazioni nel cervello delle popolazioni normali e concentrazioni nel cervello associate con l'inalazione e l'ingestione⁹.

OBIETTIVI DELLA RICERCA

Il manganese, pur essendo un metallo essenziale per l'organismo animale, rappresenta un metallo "emergente" nell'ambito delle contaminazioni ambientali, in considerazione delle sue svariate utilizzazioni produttive. La tossicità dell'elemento a carico del sistema nervoso centrale, che può esercitarsi anche attraverso l'esposizione a livelli relativamente bassi per periodi prolungati, richiede conoscenze sulla distribuzione tissutale dell'elemento e sull'accumulo nei vari distretti corporei in seguito alla supplementazione. Inoltre, è importante determinare la corrispondenza di concentrazioni abnormi del manganese in determinati distretti con alterazioni funzionali od organiche acute o croniche.

La nostra ricerca si propone di studiare la distribuzione del manganese nei tessuti ed organi del coniglio d'allevamento, la cui dieta è stata arricchita di solfato di manganese. L'allevamento contemporaneo di animali trattati e di soggetti controllo permette di confrontare i dati relativi alle analisi dell'elemento nei vari tessuti ed organi e di valutare il profilo di accumulo dopo intossicazione cronica indotta per via orale.

MATERIALI E METODI

La sperimentazione

La sperimentazione ha avuto una durata di 101 giorni. Dodici conigli di razza Grimaud di sesso femminile, prelevati da un allevamento a conduzione familiare all'età di 50 giorni, sono stati suddivisi in modo casuale in due gruppi distinti di sei esemplari ciascuno e, dopo identificazione con apposite marche auricolari, stabulati in gabbie. Le gabbie, disposte in un locale appositamente attrezzato, erano fornite di un abbeveratoio a succhiotto e di una mangiatoia divisa in settori. Per l'abbeveraggio è stata utilizzata l'acqua della rete potabile cittadina, che sottoposta ad analisi ha rivelato un contenuto di manganese di 64 mg/l.

Per il gruppo dei conigli da sottoporre a supplementazione, veniva preparata periodicamente una soluzione contenente $MnSO_4$ che era poi diluita nell'acqua di abbeverata. Ad entrambi i gruppi l'acqua veniva somministrata *ad libitum*. Sulla base dei consumi di acqua che si sono verificati, ogni coniglio di controllo assumeva una quantità giornaliera di manganese di 0,41 mg, mentre per ogni coniglio trattato tale quantità era di 4,47 mg.

Il mangime, somministrato *ad libitum* ad entrambi i gruppi, era un mangime

commerciale composto integrato, specifico per conigli. Dall'analisi chimica del mangime è emersa una concentrazione di manganese pari a 40 mg/kg. Sulla base dei consumi di mangime che si sono verificati ogni coniglio di controllo assumeva una quantità giornaliera di manganese di 7,12 mg, mentre per il coniglio trattato tale quantità era di 8,2 mg.

Le quantità giornaliere totali di manganese assunte con la dieta, comprensive di quelle dell'acqua d'abbeveraggio e di quelle del mangime, risultano quindi di 7,53 mg per ciascun coniglio di controllo e di 12,67 mg per ciascun coniglio trattato. I valori riscontrati corrispondono ad un aumento del 68,26% del manganese nella dieta del gruppo dei trattati.

Il campionamento ed il trattamento ai campioni

Dopo 30 giorni dall'inizio del trattamento è stato effettuato un prelievo di sangue con siringa eparinizzata. Alla fine dell'esperimento è stato prelevato il sangue, che è stato immesso in una provetta. In seguito i conigli sono stati sacrificati con anestesia pentobarbiturica praticata nell'aorta con siringa eparinizzata. La macellazione è proceduta con lo scuoiamento ed il sezionamento per il prelievo di tessuti ed organi.

Gli organi fegato, cervello, cuore, stomaco, pancreas, sono stati divisi in due parti, una delle quali utilizzata per gli esami isto-patologici. Degli organi rene, polmone e occhio è stato utilizzato il destro, mentre il sinistro è stato destinato agli esami suddetti. Gli arti destri anteriori e posteriori, i muscoli del diaframma e gli sterni con relativa muscolatura sono stati inseriti in un sacchetto di polietilene, così come tutti gli altri organi e, corredati di una sigla ed un numero identificativo, conservati a -18°C.

Per il sangue un'aliquota è stata congelata, mentre un'altra aliquota è stata sottoposta a centrifugazione (3000 r.p.m. per 15 min). Il plasma ottenuto, immesso in una provetta è stato congelato. Successivamente aliquote di sangue e di siero, rispettivamente di 0,1 ml e di 0,5 ml, sono state diluite in una provetta, rispettivamente 1:4 e 1:2, con una soluzione di ammonio acetato 0,5 M e Triton 0,1%. Le provette sono state agitate per 2 min e stoccate a 4 °C per un tempo massimo di 3 giorni prima dell'analisi.

Tutti gli altri campioni sono stati preparati per l'essiccamento. Dopo scongelamento sono state isolate le parti ossee e quelle muscolari dagli arti e dallo sterno; le ossa sono state pulite meccanicamente e di femore e omero è stata isolata la parte mediana. Dal globo oculare è stato isolato il cristallino e l'umor vitreo. Poi si è proceduto alla macinazione degli organi, delle parti muscolari e di quelle ossee. Un'aliquota di circa 10 g del campione così omogeneizzato è stata sottoposta ad essiccamento in stufa a 102 °C per 24 h. I campioni essiccati sono stati poi polverizzati in mortaio e, dopo immissione in contenitori di plastica, conservati a -18°C.

Successivamente i suddetti campioni sono stati mineralizzati per via umida. È stata pesata in una provetta di vetro un'aliquota di circa 250 mg di campione essiccato, cui sono stati aggiunti 2 ml di acido nitrico e 0,5 ml di acqua ossigenata. Dopo agitazione e sosta per qualche ora a temperatura ambiente, le provette sono state messe in un bagno termostato, dove sono rimaste 24 h a 90 °C. Dopo raffreddamento alle provette sono stati aggiunti 0,5 ml di acqua ossigenata. Il contenuto è stato trasferito prima in un pallone da 10 ml, dove è stato portato a volume con acqua

distillata, poi in provette di vetro con tappo di teflon. La conservazione in questi contenitori fino al momento dell'analisi è avvenuta a temperatura ambiente.

L'analisi del manganese

L'analisi è stata condotta in Spettrofotometria di Assorbimento Atomico con uno strumento Shimatsu Mod. AA6200 (Japan).

Le letture dei campioni di fegato, rene, stomaco e ossa sono avvenute con sistema di atomizzazione in fiamma ossi-acetilenica utilizzando il correttore di fondo a lampada al deuterio, una larghezza della fenditura di 0,2 nm ed una lunghezza d'onda di 279,5 nm. Il metodo di lettura è stato quello della retta di taratura con soluzioni standard di 0, 0,5, 1, 2, 5 mg/L di Mn, tempo di lettura di 5 sec e controllo ogni 50 letture del "bianco". Il limite di rilevabilità era di 0,058 mg/kg.

Le letture dei campioni di muscolo, cuore, cristallino, polmone e cervello sono avvenute con sistema di atomizzazione a fornetto di grafite con tubi pirolitici, utilizzando le medesime condizioni ottiche descritte sopra. Il metodo di lettura è stato quello della retta di taratura con soluzioni standard di 0, 5, 10, 20, 50, 100 e 200 mg/L di Mn. Il programma della fornace prevedeva 7 passaggi con temperatura di atomizzazione a 2500°C. La regolazione della sensibilità avveniva tramite controllo del flusso di argon. Il volume iniettato manualmente era di 10 ml. Il limite di rilevabilità era di 3,8 mg/kg.

Per le letture dei campioni di sangue intero e plasma, avvenute anch'esse con sistema di atomizzazione a fornetto di grafite, si è utilizzato il metodo delle aggiunte standard, con costruzione della retta di taratura sul primo campione. Al volume di 0,4 ml del campione venivano aggiunte aliquote di 10 e 20 mL di una soluzione di Mn a 0,1 mg/kg. Il programma della fornace prevedeva nove passaggi con temperatura di atomizzazione a 2500°C. Ogni 5 letture avveniva il controllo del "bianco".

La manipolazione dei campioni è stata condotta in modo da evitare tutte le possibili contaminazioni o perdite. Sono sempre stati utilizzati guanti di lattice da laboratorio. I reagenti chimici utilizzati sono stati scelti della massima purezza. Prima dell'uso, tutti i contenitori di vetro sono stati accuratamente lavati, mantenuti in una soluzione al 10% di acido nitrico, risciacquati più volte con acqua deionizzata ed asciugati in un forno ventilato.

Prima delle analisi sono state definite delle prove di validazione, riguardanti alcuni parametri come il limite di rilevabilità ed il limite di quantizzazione, la linearità, la selettività/sensibilità, la precisione, la ripetibilità e la robustezza.

La garanzia dell'accuratezza della procedura analitica, in particolare riguardo alla contaminazione e alla mineralizzazione del campione, è stata ottenuta con l'uso di materiali di riferimento standard della NBS (muscolo bovino e fegato bovino).

Il trattamento dei dati analitici

I dati relativi alle concentrazioni del manganese sono stati elaborati tramite il programma di statistica SPSS.

E' stata utilizzata la media aritmetica e la deviazione standard per il confronto dei due gruppi di campioni.

Le grandezze non parametriche sono più adatte a rappresentare i dati relativi a poche osservazioni (come nel nostro caso), poiché risentono meno dei dati estremi. Sono state utilizzate le rappresentazioni “Box and Whiskers Plot” che danno un’idea complessiva delle caratteristiche statistiche dei dati disponibili, tramite la visualizzazione di alcune grandezze, come intervallo interquartile, mediana e dati che si discostano dal gruppo degli altri (outlier). La rappresentazione è costituita da una scatola (box), all’interno della quale sono compresi il 50% dei dati; il lato inferiore del rettangolo delimita il primo quartile mentre il lato superiore delimita il terzo quartile (25-75% della distribuzione). La linea centrale rappresenta la mediana. Se i dati presentano valori fino a 1,5 intervalli interquartilici oltre i bordi inferiore e superiore del rettangolo, sono rappresentati con segmenti che si prolungano fino al valore più lontano (whiskers). Se sono presenti valori estremi, quindi non rappresentativi del resto della popolazione, vengono rappresentati singolarmente (outliers): i valori all’esterno fino a 3 intervalli interquartilici (outliers veri e propri) sono rappresentati con un asterisco per distinguerli dagli altri rappresentati con un cerchietto (outliers sospetti).

Per confrontare i due gruppi di dati fra loro e mettere in evidenza le differenze significative è stato utilizzato il test non parametrico di Mann-Whitney.

RISULTATI

Nella Tabella 1, per ogni organo e tessuto, sono espresse la media e la deviazione standard delle concentrazioni di manganese rilevate nei due gruppi di conigli. I valori sono espressi in mg/l sul tal quale per plasma e sangue ed in mg/kg sul peso secco per tutti gli altri campioni.

CAMPIONE	Trattati (n=6)	Controlli (n=5)
plasma dopo 30 gg (µg/l)	2,31 ± 0,36	2,04 ± 0,55
plasma dopo 101 gg (µg/l)	3,30 ± 0,38	2,25 ± 1,02
sangue intero dopo 101 gg (µg/l)	11,64 ± 4,19	6,34 ± 0,69
muscoli zampa anteriore (mg/kg d.w.)	0,437± 0,098	0,443 ± 0,100
muscoli zampa posteriore (mg/kg d.w.)	0,435± 0,140	0,368 ± 0,123
muscolo diaframma (mg/kg d.w.)	0,938± 0,336	0,756 ± 0,195
cuore (mg/kg d.w.)	0,870± 0,203	0,722 ± 0,274
osso omero (mg/kg d.w.)	1,41± 0,14	1,29 ± 0,15
osso femore (mg/kg d.w.)	1,35± 0,10	1,19 ± 0,16
osso sterno (mg/kg d.w.)	3,53± 0,39	4,42 ± 0,49
fegato (mg/kg d.w.)	5,89± 0,90	5,36 ± 0,83
rene (mg/kg d.w.)	6,80± 0,47	6,07 ± 0,44
stomaco (mg/kg d.w.)	8,26 ± 3,74	7,05 ± 1,50
cristallino e umor vitreo (mg/kg d.w.)	0,855 ± 0,785	0,256 ± 0,062
polmone (mg/kg d.w.)	0,455 ± 0,142	0,370 ± 0,109
cervello (mg/kg d.w.)	2,64 ± 1,04	2,02 ± 0,48

Tabella 1: medie e deviazioni standard delle concentrazioni di Mn.

Dopo 30 giorni dall'inizio del trattamento i livelli di manganese nel plasma sono più elevati nel gruppo dei conigli trattati rispetto ai controlli. La differenza nelle concentrazioni subisce un incremento ulteriore al sacrificio. Da osservare che i livelli del metallo nel sangue intero sono circa tre volte maggiori rispetto a quelli del plasma.

Le concentrazioni di manganese più elevate sono state riscontrate in stomaco, rene e fegato. I livelli presenti nel tessuto cerebrale si attestano su valori inferiori. L'osso dello sterno contiene livelli più elevati rispetto a femore e omero. Tra i muscoli, quello del diaframma ed il cuore hanno livelli superiori a quelli dei muscoli degli arti anteriori e posteriori. Basse concentrazioni di manganese sono riscontrate in polmone e cristallino. In quest'ultimo tessuto è da osservare che i conigli trattati mostrano concentrazioni considerevolmente più elevate rispetto ai controlli.

Nella Figura 1, per ciascun campione, sono rappresentate le deviazioni delle medie dei dati relativi ai conigli trattati rispetto ai controlli. Gli incrementi più elevati si hanno nel cristallino (234%), nel sangue intero (83,7%), nel plasma al sacrificio (46,6%) e nel cervello (30,6%). Minori incrementi vengono evidenziati per polmone (23,2%), stomaco (17,2%), muscolo del diaframma (24%), cuore (20,5%) e muscolo dell'arto posteriore (18,2%). Modesti sono gli incrementi in altri tessuti, quali rene (12%), fegato (9,9%), omero (9,5%) e femore (13,5%). Le variazioni registrate per l'osso dello sterno e per il muscolo dell'arto anteriore mostrano un decremento, rispettivamente del 20,1% e del 1,4%.

Le differenze tra i dati delle analisi dei due gruppi di animali sono evidenziabili

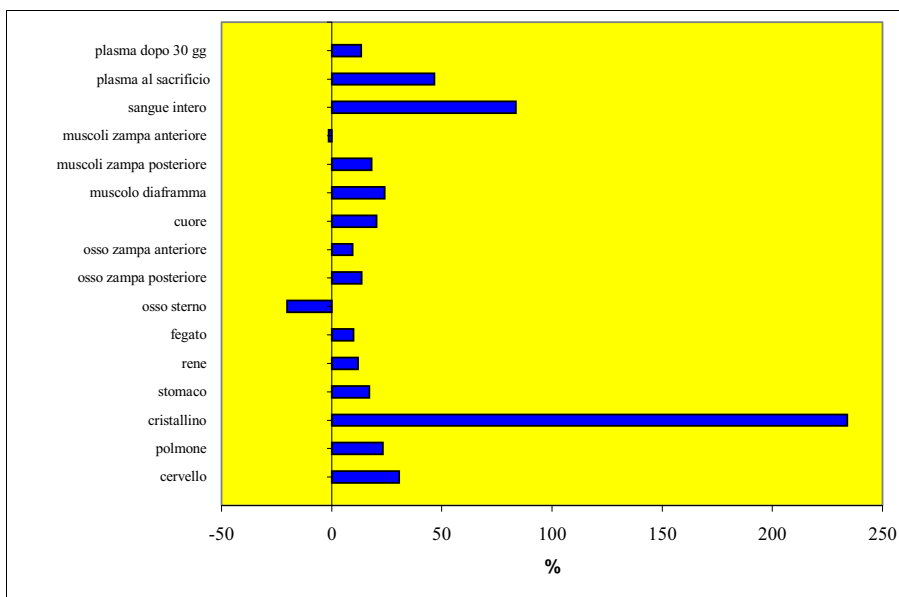


Figura 1: deviazioni rispetto alla media delle concentrazioni di manganese nei vari tessuti e organi.

con maggiore correttezza attraverso l'uso di grandezze non parametriche. Nelle figure 2, 3 e 4 vengono rappresentati i box-plot relativi ai livelli di manganese.

Nel plasma dopo 30 giorni di trattamento i conigli trattati hanno valori più elevati sia per il 1° e 3° quartile che per la mediana; tuttavia la significatività della differenza con il test di Mann-Whitney è molto bassa ($p=0,352$). Alla fine del trattamento la significatività è rilevante ($p=0,082$) e nella figura le aree dei box non sono sovrapponibili. Ciò è ancora più evidente per il sangue intero e la significatività delle differenze tra i due gruppi è elevata ($p=0,017$). I valori relativi allo stomaco dei conigli trattati sono molto dispersi e non si evidenziano differenze tra i due gruppi. Lo stesso fenomeno si registra per il fegato, anche se la significatività è più consistente ($p=0,247$). Nel rene, invece, la mediana relativa ai conigli trattati è nettamente più alta, così come sono più alti i valori inferiori; tali differenze sono evidenziate da una significatività importante ($p=0,052$). La dispersione dei dati relativi a polmone, cervello e muscoli dei soggetti trattati porta a significatività piuttosto scarse. I dati relativi alle ossa hanno la caratteristica di essere simili, sia per i conigli trattati sia per quelli di controllo. La significatività è più elevata per il femore ($p=0,177$) che per l'omero ($p=0,247$). Per l'osso dello sterno i valori relativi ai conigli di controllo sono significativamente più alti rispetto a quelli dei soggetti trattati ($p=0,017$). Per il cristallino i valori sono nettamente più alti nei conigli trattati, come evidenziato dall'elevata significatività emersa dal test ($p=0,017$).

DISCUSSIONE

L'efficienza nell'assorbimento del manganese con la dieta è piuttosto variabile e dipende in larga misura dalla quantità apportata. La dose impiegata in questa ricerca è da considerarsi bassa e tale da configurare un'intossicazione sub-cronica da manganese.

La regolazione dei livelli tissutali di manganese, controllata dal fegato e dal tratto gastrointestinale per un ampio intervallo di assunzione, non sottosta ad un perfetto meccanismo omeostatico. Le concentrazioni nel plasma sono influenzate dai livelli nella dieta. Nella nostra ricerca abbiamo verificato che in seguito al trattamento è presente un certo incremento dei livelli di manganese nel plasma. L'incremento, tuttavia, più significativo nel sangue intero, evidenzia che il metallo ha un'affinità superiore per i componenti ematici non plasmatici. Il manganese forma, infatti, legami con l'emoglobina all'interno degli eritrociti.

I risultati mostrano che, per i soggetti trattati, concentrazioni significativamente più elevate nel sangue intero e nel plasma, non corrispondono a livelli significativamente più elevati nel fegato.

Nella sperimentazione effettuata da Scheuhammer e Cherian su ratti esposti cronicamente al manganese con somministrazioni intraperitoneali sono stati trovati incrementi significativi in diversi organi, ad eccezione del fegato¹⁸. I valori relativi al fegato dei ratti, sia trattati sia di controllo, sono molto simili a quelli da noi rilevati. Questo si spiega con il fatto che il manganese viene efficacemente e velocemente eliminato dal fegato tramite secrezione nella bile, ma altresì, che l'eliminazione del metallo dipende dalla funzionalità epatica¹⁹. Per contro, le concentrazioni di manga-

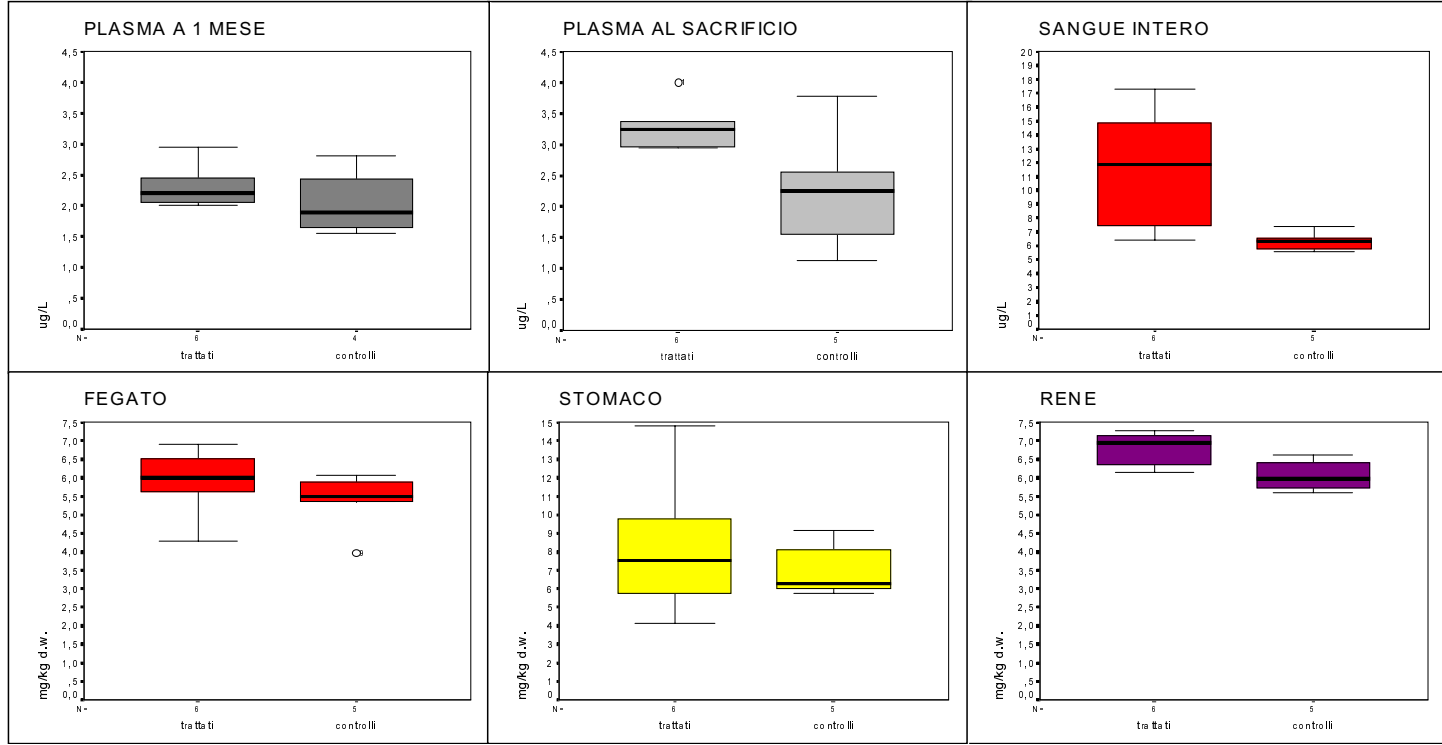


Figura 2: Box-plot delle concentrazioni di manganese in plasma, sangue, stomaco, fegato e rene

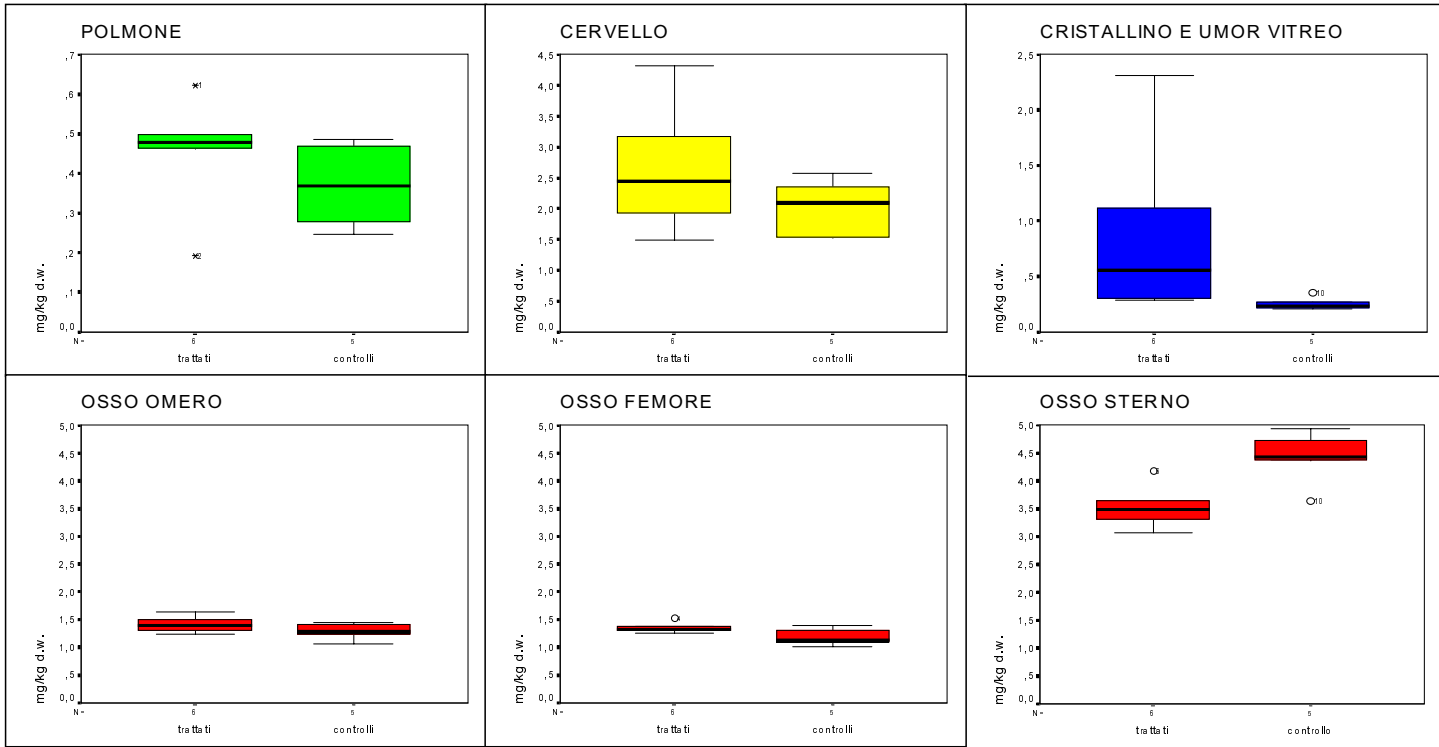


Figura 3: Box-plot delle concentrazioni di manganese in polmone, cervello, cristallino e ossa.

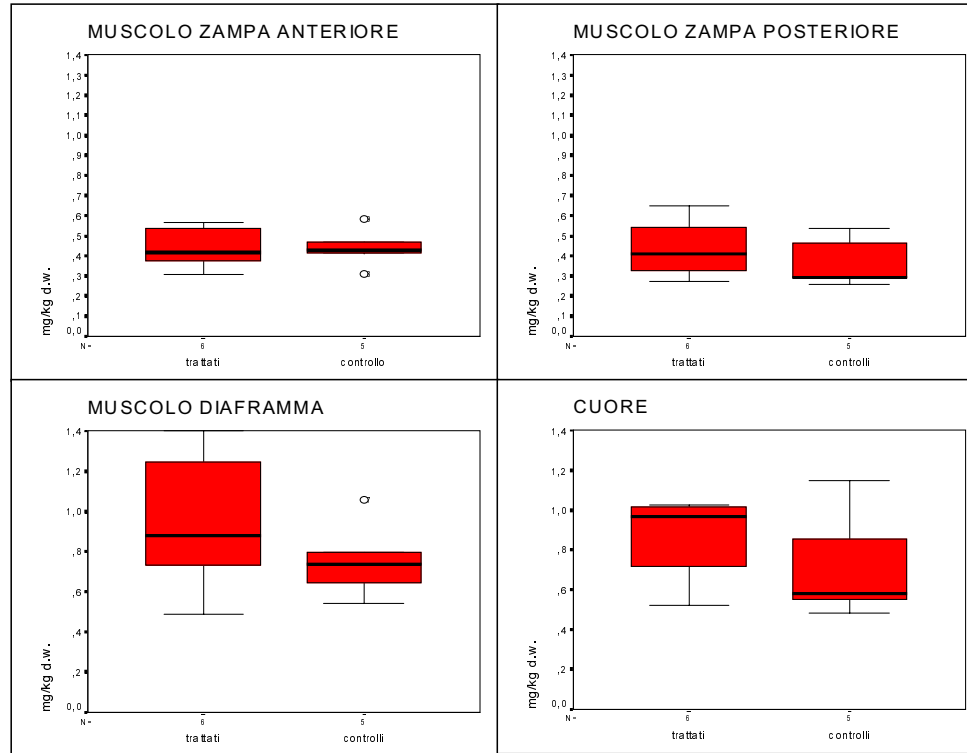


Figura 4: Box-plot delle concentrazioni di manganese nei muscoli.

nese nel femore e nel rene trovate dagli autori citati sono sensibilmente più alte di quelle da noi osservate (rispettivamente di 37,84 mg/kg e 6,58 mg/kg). I trattamenti intravenosi e intraperitoneali riportati in letteratura conducono comunque ad accumuli consistenti di manganese in vari tessuti, in particolare quello osseo e quello pancreatico. La comparazione quantitativa con i nostri rilievi sperimentali si rende difficile, poiché le vie di somministrazione i.v. e i.p. presentano una biodisponibilità totale. Nel nostro contesto sperimentale, invece, il sistema gastroenterico e l'assorbimento intestinale influenzano sensibilmente la biodisponibilità. La scelta della via della somministrazione orale è stata effettuata per la constatazione che nella realtà essa rappresenta una probabile via di assunzione, anche in considerazione della reale situazione di inquinamento ambientale da manganese.

Le concentrazioni trovate nei diversi campioni di osso non sono univoche. Nel femore e nell'omero dei conigli trattati si verifica un certo accumulo di manganese, mentre l'osso dello sterno si comporta in modo contrario. Tale differenza potrebbe essere spiegabile con la diversa matrice cartilaginea. Il tessuto osseo diventa una potenziale riserva di manganese, ma tali riserve non sono rapidamente mobilizzabili¹⁷.

Da osservare che gli organi che presentano le maggiori concentrazioni in assoluto, come stomaco, rene, fegato e cervello, hanno incrementi più ridotti rispetto a campioni come cristallino, sangue e plasma. Questi ultimi, pur presentando concentrazioni modeste, manifestano un'alta capacità di accumulo in seguito alla somministrazione. Questo fenomeno è plausibile in un contesto di sperimentazione caratterizzato da una prolungata e costante somministrazione del metallo.

Ad eccezione dell'osso dello sterno e dei muscoli dell'arto anteriore, tutti gli altri campioni presentano delle concentrazioni di manganese che aumentano per effetto del trattamento. Dal test di Mann-Whitney, ponendo il limite di significatività a $p=0,1$, emerge che le medie dei livelli di manganese sono significativamente più elevate nel gruppo dei soggetti trattati per sangue intero, cristallino, rene e plasma. Per gli altri campioni, invece, che pure presentano incrementi importanti, come il cervello, la significatività è molto debole. Al contrario per il fegato, che mostra un incremento basso, la significatività della differenza tra i due gruppi è più elevata.

CONCLUSIONI

Diversamente dagli altri elementi essenziali presenti nell'organismo, l'assorbimento del manganese non è ben regolato. La crescente diffusione ambientale di questo elemento, conseguenza degli svariati impieghi produttivi, evidenzia l'importanza di studiare gli effetti dell'esposizione cronica al metallo. L'uomo e gli animali possono essere esposti ad un eccesso di manganese attraverso l'aria respirata, l'acqua e gli alimenti. L'elemento è incontrovertibilmente tossico attraverso le vie di esposizione orale, inalatoria e intravenosa. La tossicità provocata dal manganese può portare gravi e persistenti danni neurologici. I fenomeni di tossicità sono stati riportati principalmente per soggetti esposti ad alti livelli di manganese nell'aria degli ambienti, ma anche per l'eccessiva esposizione con la dieta. Ricerche epidemiologiche ed esperimenti *in vitro* suggeriscono che la neurotossicità può verificarsi anche con esposizioni a concentrazioni del metallo basse, non soltanto attraverso la via ina-

latoria ma anche attraverso la dieta. La presenza nell'aria del metilciclopentadienil-tricarbonil-manganese per effetto dell'additivazione della benzina, l'utilizzo di prodotti fitosanitari a base di manganese e la presenza di formulazioni a base di soia destinate all'infanzia con quantità significative di manganese, possono costituire delle potenziali fonti di pericolo per l'uomo.

I fenomeni neurotossici sono particolarmente importanti gli individui giovani perché le perturbazioni indotte dal metallo al SNC possono portare a disordini più gravi nell'età adulta. Il cervello, infatti, è più vulnerabile nei primi mesi di vita poiché i neuroni, i dendriti e le sinapsi sottostanno ad un'intensa proliferazione. L'intrusione di sostanze potenzialmente tossiche, come il manganese, perturba l'emergente organizzazione neurale e può esercitare effetti nel lungo periodo. Ricerche effettuate sui ratti hanno evidenziato che il manganese può produrre disturbi dell'apprendimento¹⁷.

La presente ricerca ha evidenziato che molti organi accumulano manganese, quando questo è supplementato per un medio periodo a basse dosi nella dieta. Il cervello, considerato l'organo principale per la quantificazione del rischio, presenta concentrazioni sostanzialmente più elevate negli animali trattati rispetto a quelli non trattati, sebbene l'aumento tissutale sia nettamente inferiore a quello programmato nella dieta. Si evidenzia comunque, che l'aumento dei livelli di manganese in seguito al trattamento coinvolge la quasi totalità dei campioni, pur tra differenze relativamente agli incrementi percentuali ed alla significatività statistica. I liquidi biologici, come il sangue intero ed il plasma, possono monitorare lo stato dell'elemento, anche se risentono in una certa misura dell'esposizione più recente.

La conoscenza dei livelli nel plasma, in combinazione con quella di altri parametri, come quelli ematologici e le variazioni biochimiche, possono fornire importanti contributi per studiare l'intossicazione cronica da manganese. L'osservazione dei cambiamenti comportamentali negli animali, per esempio attraverso test neurofunzionali, può essere importante al fine di formulare ipotesi patogenetiche dell'assunzione e rappresenta la miglior via per monitorare l'eccessiva esposizione al manganese¹².

Le ricerche future saranno volte ad approfondire questi aspetti sulla base di nuove sperimentazioni.

Parole chiave: manganese, coniglio, neurotossicità, distribuzione tissutale del manganese.

Key words: manganese, rabbit, neurotoxicity, manganese tissue disposition.

Mots-clefs: manganèse, lapin, neurotoxicité, partage tissutal du manganèse.

RIASSUNTO - Il manganese è un elemento essenziale per le funzioni metaboliche, ma può diventare tossico in condizioni di esposizione cronica. Le manifestazioni più distruttive e conosciute della tossicità del manganese sono alcune sindromi neurologiche, che tendono ad essere più estese negli animali giovani rispetto a quelli adulti. L'assunzione del manganese da parte dell'organismo varia fortemente secondo le scelte alimentari, la composizione dell'acqua e la qualità dell'aria respirata.

Nonostante sia stato scoperto nel 1774, l'utilizzo del manganese risale ai tempi più antichi. Attualmente è uno dei metalli più utilizzati, con numerose applicazioni,

in particolare nella produzione degli acciai. Negli ultimi anni si è assistito ad una maggiore diffusione del metallo nell'ambiente aereo, a causa dei suoi recenti utilizzi nella produzione di carburanti e delle emissioni industriali.

Questa ricerca è stata intrapresa per determinare la distribuzione negli organi e nei tessuti del manganese somministrato a bassi livelli attraverso con la dieta. Nella sperimentazione un gruppo di conigli è stato trattato con $MnSO_4$ nell'acqua di abbeverata per 60 giorni, mentre un gruppo fungeva da controllo. Campioni di sangue intero, plasma, fegato, rene, stomaco, polmone, cervello, cuore, cristallino, muscoli ed ossa sono stati analizzati tramite spettrofotometria di assorbimento atomico. I risultati mostrano che le concentrazioni di manganese in molti tessuti ed organi sono più elevate nei conigli trattati rispetto ai controlli. Lo stomaco, il rene ed il fegato rivelano i livelli più elevati con valori di 8,26 mg/kg, 6,80 mg/kg e 5,89 mg/kg, rispettivamente. Gli incrementi più significativi si hanno, invece, nel cristallino (234%), nel sangue (83,7%), nel plasma (46,6%) e nel cervello (30,6%). Le differenze tra i due gruppi sono statisticamente significative per il cristallino ($p=0,017$), per il sangue ($p=0,017$), per il rene ($p=0,052$) e per il plasma ($p=0,082$).

SUMMARY - Manganese is an essential nutrient for metabolic functions, but at high intake rates can lead to adverse biological consequences, like neurological disorders. The neuronal damage caused by the manganese tends to be more extensive in young, immature animals than in adults. Manganese intake can vary greatly with food choices, water composition and ambient-air quality.

While manganese was discovered in 1774, its use goes back to the Stone Age. Now it is one of the most widely used metals in the world with many applications, especially in the manufacture of steel. In the last few years an increase of Mn-levels in the ambient air is observed, because of the anthropogenic sources like combustion of fossil fuels and the emission of manganese from industrial source.

This research studies the distribution of manganese in some tissues after supplementation of low Mn-levels in feed. One group of rabbits were treated for 60 days with $MnSO_4$ in the water, while another group of animals was the control. Blood, plasma, liver, kidney, stomach, lung, brain, heart, crystalline, some skeletal muscles and bones were analysed by atomic absorption spectrophotometer. Results show that manganese levels increase in many tissues in the treated group. Stomach, kidney and liver have the highest level with values of 8,26 mg/kg, 6,80 mg/kg e 5,89 mg/kg, respectively. The more significant increases were in crystalline (234%), in blood (83,7%), in plasma (46,6 %) and in brain (30,6%). Differences between groups are significant in crystalline ($p=0,017$), in blood ($p=0,017$) in kidney (0,052) and in plasma ($p=0,082$).

RÉSUMÉ - Le manganèse est un élément essentiel pur le fonctions métaboliques mais pot devenir toxique dans la condition d'exposition chronique. La manifestation plus destructive et connue de la toxicité du manganèse est un syndrome neurologique, que tendon être plus grand dans les animaux jeun respect les adultes. L'apport du manganèse du part des organismes varie fortement a second des choisse alimenter, de la composition de l'eau e de la qualité de l'air respiré.

Cela il a été découvert en 1774, l'utilisation du manganèse remonte aux temps

de la piètre. Aujourd'hui il est un des métaux plus utilisés, avec nombreuse application, in particulier dans la production des aciers. Dans la dernière année nous avons un major diffusion de métaux dans air, aussi à cause du sien récente utilisation dans la production des carburants.

Cette recherche a été intrants pour déterminer la distribution dans les organes e dans les tissus des manganèse supplémenté a petits niveaux avec la dite. Dans l'expérimentation un group des lapins a été traité avec $MnSO_4$ dans l'eau d'abreuvement pour 60 jour, tandis que l'autre group était le control. Champions de sangle inter, plasma, foie, reine, estomac, poumon, cervelle, cour, cristallin, muscol et osas à été analité tramait spectrophotomètre des absorbement atomique. Les résultats indiquent que les concentrations de manganèse dans les pus part de tissu et organe sont plus élevé dans les lapins traité respect aux les lapins controls. Les estomaque, la reine et le foie rivelaine les niveaux plus élevés avec teneur de 8,26 mg/kg, 6,80 mg/kg 5,89 mg/kg respectivement. Les incrémentes plus significative sont, au contraire, dans le cristallinien (234%), le sangle (83,7%), le plasma (46,6%) et la cervelle (30,6%). Les différences trac les doux groups sont statistiquement significatifs dans le cristallin ($p=0,017$), dans la sangle ($p=0,017$), dans la reine ($p=0,052$) e dans le plasma ($p=0,082$).

BIBLIOGRAFIA

- 1) BARCELOUX D.G. (1999) Manganese. *Clinical Toxicology*, 37(2), 293-307.
- 2) REILLY C. (1991) *Metal Contamination of Food*. 2° ed., Elsevier, Essex.
- 3) PAL P.K., SAMII A., CALNE D.B. (1999) Manganese Neurotoxicity: A Review of Clinical Features, Imaging and Pathology. *NeuroToxicology*, 20 (2-3), 227-238.
- 4) DAVIDSON L., CEDERBLAD A., LONNERDAL B. (1989) Manganese retention in man: a method estimating manganese absorption in man. *American Journal Clinical Nutrition*, 49, 170-179.
- 5) WENLOCK R.W., BUSS D.H., DIXON E.J. (1979) Trace Nutrients 2. Manganese in British foods. *British Journal Nutrition*, 41, 253-261.
- 6) Società Italiana di Nutrizione Umana (1996) Livelli di Assunzione Raccomandati di Energia e Nutrienti per la Popolazione Italiana. SINU, Roma.
- 7) COMMISSION OF EUROPEAN COMMUNITIES (1993) Nutrient and energy intakes for the European Community. Report of the Scientific Committee for Food, thirty-first series, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- 8) HURLEY L.S., KEEN C.L. (1987) Manganese. In: *Trace Elements in Human Health and Animal Nutrition*. Ed Underwood E, Mertz E. ed., New York, Academic Press, 185-223.
- 9) ANDERSEN M.E., GEARHART J.M., CLEWELL H.J. (1999) Pharmacokinetic Data Needs to Support Risk Assessments for Inhaled and Ingested Manganese. *NeuroToxicology*, 20 (2-3), 161-172.

- 10) FECHHTER L.D. (1999) Distribution of Manganese in Development. *Neuro-Toxicology*, 20(2-3), 197-202.
- 11) BOZZA MARRUBINI M.L., GHEZZI LAURENTI R., UCCELLI P. (1987) Intossicazioni acute; meccanismi, diagnosi e terapia, seconda edizione. OEMF s.p.a., 714-715.
- 12) GREGER J.L. (1999) Nutrition Versus Toxicology of Manganese in Humans: Evaluation of Potential Biomarkers. *NeuroToxicology*, 20(2-3), 205-212.
- 13) ZHENG Y.X. (1999) Manganese debated. *Working Life Research and Development News. Newsletter* n.4.
- 14) KONDAKIS X.G, MAKRIS N., LEOTSINIDIS M., PRINOU M., PAPAPETROPOULOS T. (1989) Possible health effects of high manganese concentration in drinking water. *Archives Environmental Health*, 44, 175-178.
- 15) PAL P.KR., SAMII A., CALNE D.B. (1999) Manganese Neurotoxicity: A review of Clinical Features, Imaging and Pathology. *NeuroToxicology*, 20(2-3), 227-238.
- 16) SHAUSS A.G. (1996) Minerals, trace Elements and Human Health. Life Sciences press, Tacoma (WA).
- 17) KEEN C.L., ENSUNSA J.L., WATSON M.H., BALY D.L., DONOVAN S.M., MONACO M.H., CLEGG M.S. (1999) Nutritional Aspects of Manganese From Experimental Studies. *NeuroToxicology* 20, (2-3), 213-224.
- 18) SCHEUHAMMER A.M., CHERIAN M.G. (1983) The influence of manganese on the distribution of essential trace elements. II The tissue distribution of manganese, magnesium, zinc, iron, and copper in rats after chronic manganese exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 12, 361-370.
- 19) SCHEUHAMMER A.M. (1983) Chronic manganese exposure in rats: Histological changes in the pancreas. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 12, 353-360.