

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

*На правах рукописи*

Казакова Татьяна Витальевна

**Закономерности формирования  
метаболического и элементного гомеостаза,  
поведенческих и когнитивных функций потомства  
при пренатальном воздействии марганца  
(экспериментальное исследование)**

1.5.5. – Физиология человека и животных

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук,  
профессор С.В. Нотова

Оренбург – 2024

## СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
<b>ГЛАВА 1. СИСТЕМНО-БИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛИ МАРГАНЦА В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ.....</b>	<b>18</b>
1.1 Физико-химическая характеристика марганца.....	18
1.2 Влияние марганца на основные функции и физиологические процессы организма.....	20
1.3 Источники марганца, пути его поступления в организм.....	25
1.4 Особенности метаболизма марганца.....	33
1.5 Функциональное состояние организма на фоне избыточного поступления марганца.....	35
<b>ГЛАВА 2. ОРГАНИЗАЦИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>47</b>
2.1 Организация исследования.....	47
2.2 Методы исследования.....	54
<b>ГЛАВА 3. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ, ПОВЕДЕНИЕ И КОГНИТИВНЫЕ СПОСОБНОСТИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ НА ФОНЕ СТРЕССОРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ МАРГАНЦА.....</b>	<b>66</b>
3.1 Динамика массы тела и состояние репродуктивной системы лабораторных животных.....	67
3.2 Оценка показателей физического развития лабораторных животных.....	69
3.3 Особенности поведенческих реакций лабораторных животных.....	72
3.4 Особенности когнитивных способностей лабораторных животных.....	78
<b>ГЛАВА 4. МОРФОБИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ И ЭЛЕМЕНТНЫЙ СТАТУС ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ НА ФОНЕ СТРЕССОРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ МАРГАНЦА.....</b>	<b>85</b>
4.1 Особенности гематологических показателей крови лабораторных животных.....	86
4.2 Особенности биохимических показателей крови лабораторных	

животных.....	88
4.3 Оценка уровня марганецсодержащих ферментов в сыворотке крови лабораторных животных.....	90
4.4 Оценка уровня нейроспецифических показателей в сыворотке крови лабораторных животных.....	92
4.5 Особенности валового содержания химических элементов в сыворотке крови лабораторных животных.....	94
4.6 Особенности валового содержания химических элементов в коре головного мозга лабораторных животных.....	97
4.7 Особенности распределения химических форм марганца в сыворотке крови лабораторных животных.....	100
<b>ГЛАВА 5. ОСОБЕННОСТИ ИНТЕГРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В ОРГАНИЗМЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ НА ФОНЕ СТРЕССОРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ МАРГАНЦА.....</b>	<b>106</b>
5.1 Интегральные взаимосвязи уровня химических элементов сыворотки крови и коры головного мозга с гематологическими и биохимическими показателями крови лабораторных животных.....	106
5.2 Интегральные взаимосвязи уровня химических элементов сыворотки крови и коры головного мозга с марганецсодержащими ферментами и нейроспецифическими показателями лабораторных животных.....	107
5.3 Интегральные взаимосвязи уровня химических элементов в сыворотке крови и коре головного мозга лабораторных животных.....	109
5.4 Интегральные взаимосвязи уровня металл-лигандных форм марганца с валовым содержанием данного элемента в сыворотке крови и коре головного мозга лабораторных животных.....	111
<b>ГЛАВА 6. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....</b>	<b>114</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>139</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>140</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....</b>	<b>142</b>

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	144
Приложение А.....	185
Приложение Б.....	187
Приложение В.....	188
Приложение Г.....	189
Приложение Д.....	190

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Mn – марганец	ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
P <sub>♀</sub> – самки крыс	ГЛ – глюкоза
F <sub>0♀</sub> – самки крыс	ОБ – общий белок
F <sub>1</sub> – животные первого поколения	АЛБ – альбумины
F <sub>2</sub> – животные второго поколения	КР – креатинин
ГнРГ – гонадотропин-рилизинг гормон	ОБл – общий билирубин
ЛГ – лютеинизирующий гормон	ХЛ – холестерин
ФСГ – фолликулостимулирующий гормон	ТГ – триглицериды
ЛД50 – полулетальная, или средняя смертельная доза	МОЧ – мочевины
ИП – индекс плодовитости	АРГ1 – аргиназа
ИБ – индекс беременности	СОД2 – супероксиддисмутаза
МК – массовый коэффициент	АХЭ – ацетилхолиэстераза
ЦНС – центральная нервная система	ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
ПДК – предельно допустимая концентрация	Mn-A2M – фракция марганца, связанная с α2-макроглобулином
РА – реакция активации	Mn-Tf/Alb – фракция марганца, связанная с трансферрином/альбумином
РПА – реакция повышенной активации	Mn-LMM – фракция марганца, связанная с низкомолекулярными соединениями
РСА – реакция спокойной активации	Mn-free – свободный неорганический марганец
РТ – реакция тренировки	

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность исследования.** Одной из важнейших проблем, стоящих перед современной физиологией, является изучение особенностей адаптации организма человека и животных к изменяющимся условиям среды обитания. Актуальность данной проблемы обусловлена высокими темпами антропогенной трансформации биосферы, вызванной увеличением техногенных потоков различных загрязнителей и изменением биогеохимической организованности среды обитания, что приводит к развитию дезадаптивных процессов в живых системах (Евстафьева Е.В. и др., 2023; Осадчук Л.В. и Осадчук А.В., 2023; Радыш И.В. и др., 2023).

Выработанные в процессе эволюции механизмы регуляции функций в меняющихся условиях являются целесообразными и имеют важное приспособительное значение, направленное на сохранение нормальной жизнедеятельности целостного организма (Агаджанян Н.А., 2012). Однако чрезмерное напряжение регуляторных механизмов приводит к истощению функциональных резервов и потере возможности осуществлять соответствующие перестройки структурно-функциональных связей со средой (Меерсон Ф.З., 1981). Этому способствуют не только экстремальные воздействия окружающей природной среды, но и экологические условия (Severin A.E. et al., 2021). По данным ВОЗ, до 30 % вклада в изменения гомеостатических реакций организма и снижение его адаптационного потенциала вносит именно состояние окружающей среды (Ермакова Н.В. и Торшин В.И., 2019).

Оренбургская область является одним из наиболее неблагоприятных в экологическом и биогеохимическом плане регионов РФ, располагающих крупной многоотраслевой промышленностью (Сальникова Е.В. и др., 2019; Шестакова Е.В. и др., 2023). Согласно Государственному докладу «О состоянии и об охране окружающей среды РФ» и информации Росгидрометра, подземные воды и почвы Оренбуржья содержат повышенный уровень марганца (Mn). По результатам исследования элементного статуса, который является показателем

эколого-физиологической адаптации, в волосах жителей, проживающих на данной территории, уровень Mn превышает референтные значения (Скальный А.В., 2018). Известно, что Mn входит в структуру ключевых ферментных систем центральной нервной системы, участвует в функционировании ферментативного звена антиоксидантной защиты организма, энергетическом обмене, поддержании функции иммунной и репродуктивной систем, опорно-двигательного аппарата, а также в процессах детоксикации и других важных физиологических функциях организма (Радыш И.В. и др., 2017). Сообщается, что колебания Mn во внешней среде могут привести к срыву регуляции адаптационных процессов и явиться причиной развития функциональных нарушений различных систем организма (Оберлис Д. и др., 2018; Li L. and Yang X., 2018; Erikson K.M. and Aschner M., 2019; Balachandran R.C. et al., 2020). Подобные данные обосновывают значимость проведения исследований по изучению закономерностей и механизмов адаптации организма в условиях стресс-потенцирующего антропогенного загрязнения среды обитания.

Особого внимания заслуживает изучение действия химических стрессоров экзогенной природы на женский организм. Известно, что адаптивность и резистентность женского организма в значительной степени определяют особенности течения беременности и её исходы (Агаджанян Н.А. и др., 1996). Рождение здорового потомства, способного адаптироваться к условиям окружающей среды, во многом зависит от становления органов и их систем в ходе эмбриогенеза (Нефьодова О.О. и др., 2017; Sewberath Misser V.H. et al., 2022). При физиологической беременности уровень Mn в пуповинной крови увеличивается, что свидетельствует о высокой биологической потребности плода в данном микроэлементе (Музыка Е.А. и др., 2021; Henn B.C. et al., 2017). Однако в литературе представлены единичные работы, раскрывающие закономерности и механизмы поддержания постоянства внутренней среды на фоне повышенного поступления Mn во время гестации. Возникает предположение, что воздействие Mn в период пренатального развития организма может трансформировать

свойственные раннему онтогенезу закономерности формирования регуляторных механизмов на клеточном, тканевом и системном уровнях и привести к изменению характера адаптивных реакций после рождения (Евсюкова И.И., 2011; Hill D.S. et al., 2015).

Реализация физиологических механизмов адаптивной перестройки женского организма в неблагоприятных экологических условиях сопровождается сдвигами элементного гомеостаза и возникновением микроэлементозов (Скальный А.В. и др., 2023). Это связано с тем, что формирование элементного состава организма определяется как его текущей физиологической потребностью в химических элементах, так и во многом зависит от биогеохимических факторов и техногенной нагрузки (Миняйло Л.А. и Корчина Т.Я., 2022). Исследования последних лет показывают большую значимость оценки не только валового содержания элементов в различных биосубстратах, но и отдельных химических форм металлов. Причинами этого является существенная роль металл-лигандных фракций в молекулярных механизмах адаптации организма на различных этапах онтогенеза (Notova S.V. et al., 2022; Michalke B., 2022). Следует отметить, что адаптация женского организма и плода к воздействию стресс-факторов проявляется не только комплексом физиологических и биохимических реакций, но и существенным изменением поведения и когнитивных функций (Стратилов В.А. и др., 2021; Хлебникова Н.Н. и др., 2021).

В связи с вышесказанным, особый интерес представляет изучение закономерностей формирования метаболического и элементного гомеостаза, поведенческих и когнитивных функций материнского организма и потомства в условиях стресс-воздействия избытка марганца.

**Степень разработанности темы.** Большинство научных исследований посвящено изучению состояния функциональных показателей и адаптационных возможностей организма человека в условиях профессиональной деятельности, использующих в рабочем цикле соединения Mn (Mehrifar Y. et al., 2020). В работах показано, что воздействие Mn в высоких дозах приводит к нарушению регуляции стресс-системы рабочих, что является причиной возникновения



нейропсихических и эндокринных заболеваний (Чашин М.В. и др., 2014; Lotz A. et al., 2021).

В условиях современных техногенных перемен увеличивается риск хронического воздействия Мп в относительно низких дозах на население не занятого в производстве. В связи с чем растет интерес к работам, в которых оценивается адаптационный потенциал различных групп населения к меняющимся условиям среды обитания (Bouchard M.F. et al., 2018; Adamson S.X. et al., 2018). Особого внимания заслуживают исследования по изучению влияния антропогенного стресса в период физиологической беременности на течение и её исход, развитие плода, а также адаптационные и генеративные возможности организма потомства (Аксенов А.Н. и др., 2022). В результате различных флуктуаций в критический период развития существующая организация систем и подсистем может изменяться, что может стать причиной снижения регуляторной деятельности организма (Шаханова А.В., 2015). В ряде работ было показано, что воздействие стрессовых факторов различной природы, в том числе и тяжелых металлов, в период пренатального онтогенеза приводило к изменениям функционирования гипоталамо-гипофизарной надпочечниковой системы и поведения потомства (Роговин К.А., 2019; Hartman S. et al., 2018). В экспериментальных работах было установлено, что повышенное воздействие Мп на беременных самок крыс в период плацентарной фазы развития плода способствовало ухудшению памяти и способности к обучению потомства (Гелашвили О.А., 2008; Beasley T.E. et al., 2022; Oshiro W.M. et al., 2022). В исследовании, проведенном Hill D.S. с соавторами (2015) на грызунах, было продемонстрировано, что внутриутробное воздействие Мп с 1 по 10 день гестации, соответствующее эмбриональному и раннему фетальному периодам развития, привело к многочисленным отклонениям в поведении потомства, которые сохранялись и во взрослом возрасте животных.

Необходимо подчеркнуть, что исследований, посвященных изучению адаптационных механизмов женского организма, выявлению особенностей течения гестации и функционального состояния потомства в условиях

хронического стресса, обусловленного воздействием Mn недостаточно. Отдаленные последствия воздействия Mn на потомстве второго поколения до настоящего времени не изучены. Следует добавить, что научные коллективы ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук» и Института биоэлементологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет» имеют многолетний опыт работы в области изучения биологических эффектов металлов и их соединений, роли макро- и микроэлементов в организме человека и животных.

**Цель работы:** выявить закономерности формирования метаболического и элементного гомеостаза, поведенческих и когнитивных функций материнского организма и потомства на фоне воздействия марганца в пре- и гестационный периоды.

**Задачи исследования:**

1. Изучить особенности морфофункциональных показателей, репродуктивную способность, поведенческие и когнитивные функции, состояние неспецифических адаптационных реакций у половозрелых крыс в норме и подвергшихся хроническому воздействию марганца.

2. Исследовать на экспериментальных моделях хронического субтоксического перорального и пренатального воздействия марганца состояние белкового, углеводного и липидного обменов, уровни марганецсодержащих ферментов и нейроспецифических показателей.

3. Выявить закономерности формирования элементного гомеостаза у половозрелых крыс в экспериментальных моделях перорального и пренатального воздействия марганца.

4. Изучить на экспериментальных моделях хронического субтоксического перорального и пренатального воздействия марганца закономерности распределения металл-лигандных форм данного химического элемента в сыворотке крови.

5. Установить взаимосвязи между содержанием химических элементов в различных биосубстратах (сыворотка крови, кора головного мозга) и

морфобиохимическими параметрами крови лабораторных животных на фоне хронического воздействия марганца.

**Научная новизна работы.** С использованием системного, комплексного и лонгитюдинального подходов в работе впервые:

– установлено, что хронический стресс, обусловленный повышенным воздействием Mn на самок крыс в пре- и гестационный периоды, приводит к устойчивым нарушениям двигательного, эмоционального и исследовательского поведения, ослаблению когнитивных функций в ближайшем и последующем поколении. В экспериментальных условиях у половозрелых животных первой линии отмечается высокая двигательная и ориентировочно-исследовательская активность, тревожность в совокупности с ухудшением пространственной ориентации и способности к обучению. У животных второй линии отмечается увеличение эмоциональной напряженности, ориентировочно-исследовательской активности и ухудшение пространственной памяти, однако менее выраженное;

– обнаружено, что хронический стресс, обусловленный воздействием Mn на самок крыс в пре- и гестационный периоды приводит к адаптационно-компенсаторной активации ферментных систем организма, что выражается повышением уровня марганецсодержащих ферментов: в сыворотке крови самок крыс отмечается более высокое содержание супероксиддисмутазы и аргиназы, у половозрелых животных первого поколения – аргиназы;

– выявлены закономерности формирования элементного гомеостаза материнского организма и организма половозрелого потомства первого поколения, подвергшихся стресс-потенцирующему действию Mn: в сыворотке крови самок крыс отмечается высокий уровень Mn на фоне более низкого содержания Ca, K, Mg, Cu и Fe, в коре головного мозга отмечается накопление тяжелых металлов Mn, Pb, Hg и Sr на фоне снижения уровня Fe и I; у животных первого поколения в сыворотке крови установлен более низкий уровень K, Mg, Fe и Zn, в коре головного мозга – Mg, Fe, Se и Co на фоне повышенного содержания Mn;

– установлены закономерности распределения металл-лигандных форм Mn на фоне воздействия данного металла на самок крыс в пре- и гестационный периоды. Показано, что снижение адаптационных ресурсов материнского организма и потомства обусловлено повышением уровня низкомолекулярной фракции марганца (Mn-LMM) в сыворотке крови, способствующей накоплению Mn в коре головного мозга, что оказывает нейротоксический эффект и приводит к увеличению содержания в сыворотке крови самок крыс нейроспецифического белка S100B, у половозрелых животных первого поколения – ацетилхолинэстеразы;

– определена взаимосвязь элементного состава различных биосубстратов (сыворотка крови, кора головного мозга) с морфобиохимическими показателями на фоне воздействия Mn. Показано, что Mn-опосредованный стресс крыс приводит к изменениям связей между метаболическими параметрами. Наиболее выраженная внутри- и межсистемная интеграция функционального состояния систем отмечается в организме самок крыс в условиях повышенного перорального поступления Mn в прегестационный период, что свидетельствует о напряжении в работе регуляторных адаптационных механизмов;

– разработана и запатентована модель энцефалопатии у потомства при хроническом субтоксическом воздействии Mn в пренатальный период развития для изучения механизмов действия данного тяжелого металла в эксперименте (патент № 2794816).

**Теоретическая значимость работы.** Полученные в ходе исследования данные дополняют знания о влиянии Mn в период физиологической беременности на регуляторно-адаптивные возможности потомства двух поколений, что имеет важное фундаментальное значение для адаптационной физиологии. Результаты исследования расширяют основные положения концепции о биологической надежности и вносят существенный вклад в фундаментальные теории пренатального и постнатального онтогенеза.

В работе получено новое экспериментально обоснованное знание о вкладе воздействия Mn в период физиологической беременности крыс линии Wistar на

формирование определенного поведенческого фенотипа потомства двух поколений. Результаты исследования свидетельствуют о существенном влиянии воздействия Mn в период пренатального развития на функционирование нервной системы потомства нескольких поколений в более позднем постнатальном онтогенезе. Исследование биологических эффектов, лежащих в основе нарушения поведенческих и когнитивных реакций с учетом воздействия Mn в период пренатального развития, позволяет раскрыть новые аспекты взаимодействия эндогенных и экзогенных факторов в формировании фенотипа организма. Применяемый комплексный подход оценки элементного статуса с использованием современных технологий анализа химических форм металлов вносит новый вклад в понимание механизмов переноса Mn через гематоэнцефалический барьер, что относится к области фундаментальных знаний. Таким образом, полученные результаты расширяют теоретические основы физиологии и формируют предпосылки для проведения дальнейших разработок по данной проблеме.

**Практическая значимость работы.** Полученные данные в ходе экспериментального исследования имеют потенциальную практическую значимость. Выявленные изменения в распределении Mn по его металл-лигандным формам в сыворотке крови могут быть использованы при разработке диагностических методов, направленных на оценку возможных последствий хронического субтоксического воздействия Mn на организм в геохимических провинциях с высоким содержанием данного металла, что является основой первичной профилактики, являющейся одним из приоритетных направлений инновационного развития здравоохранения России, закрепленных в «Стратегии развития медицинской науки РФ до 2025 года». В связи с этим, результаты проведенного исследования позволяют рекомендовать использовать сывороточный уровень низкомолекулярной фракции марганца (Mn-LMM) в качестве предиктора накопления Mn в головном мозге и развития марганец-зависимых неврологических расстройств.

Данные, полученные при изучении влияния Mn на организм, могут быть

использованы в лекционных курсах и на практических занятиях в преподавании медико-биологических дисциплин (биология; общая, возрастная, адаптационная и экологическая физиология).

Результаты демонстрируют перспективность продолжения изучения роли хронического субтоксического воздействия Mn в регуляции функций организма, детализации механизмов действия Mn с целью повышения эффективности профилактических и лечебных мероприятий.

**Теоретико-методологическая основа исследования.** Теоретической и методологической основой исследований являются научные труды и разработки отечественных и зарубежных авторов, посвященные изучению механизмов адаптации организма в условиях стресс-потенцирующего антропогенного загрязнения среды обитания. Теоретическую основу диссертации составили научные представления:

- о теории процессов роста и развития, возрастных и адаптационных особенностях физического развития (Аршавский И.А., 1967; Светлов П.Г., 1960; Безруких М.М. и др., 2003);

- о системных механизмах поведения человека и животных (Блум Ф. и др., 1988; Судаков К.В. и Баич М., 1990; Wishaw I.Q. and Kolb B., 2005);

- о роли макро- и микроэлементов в молекулярных механизмах адаптации (Войнар А.О., 1960; Бабенко Г.А., 1965; Панченко Л.Ф. и др., 2004; Скальный А.В., 2004; Радыш И.В. и др., 2017; Оберлис Д. и др., 2018);

- о стрессе и других неспецифических адаптационных реакциях организма (Селье Г., 1960; Гаркави Л.Х., 1990; Агаджанян Н.А., 2012);

- о динамическом равновесии целостного организма с явлениями окружающего мира (Анохин П.К., 1975; Агаджанян Н.А., 2012);

- о донозологической диагностике и вопросах здоровьесбережения (Агаджанян, Н.А. и др., 2006; Баевский Р.М. и Берсенева А.П., 2008).

Методологическую основу исследования составили комплексный, системный и лонгитюдинальный подходы к изучению закономерностей формирования элементного гомеостаза и поведенческих реакций потомства на

фоне пренатального воздействия Мп с использованием поведенческих, биохимических, иммунологических, спектральных и хроматографических методов исследования.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Хроническое субтоксическое воздействие Мп на самок крыс в прегестационный период приводит к формированию напряжения адаптационных механизмов, нарушению метаболического и элементного гомеостаза, снижению уровня фертильности.

2. Хроническое субтоксическое воздействие Мп в пре- и гестационном периодах приводит к формированию дисфункциональных изменений в морфогенезе, что выражается в задержке физического развития, поведенческих и когнитивных нарушениях потомства в двух поколениях.

3. Хроническое субтоксическое воздействие Мп на самок крыс в пре- и гестационном периодах приводит к формированию дисфункциональных отклонений в метаболическом и элементом гомеостазе, опосредующих снижение функциональных резервов у половозрелого потомства первого поколения.

4. Хроническое субтоксическое воздействие Мп в пре- и гестационном периодах приводит к дисфункции холинергической системы потомства первого поколения.

5. Снижение адаптационно-функциональных резервов материнского организма и потомства первой линии связано с повышенным образованием низкомолекулярной фракции Мп.

**Степень достоверности результатов.** Достоверность проведенного исследования и выводов определяется обоснованностью и четким методологическим подходом, позволяющим в полной мере реализовать задачи, поставленные в работе; формированием достаточного количества (n=160) наблюдений; наличием групп сравнения; использованием апробированных методов когнитивного и поведенческого исследования (тест «Водный лабиринт Морриса», тест «Открытое поле», тест «Черно-белая камера»), входящих в перечень установок для выполнения психофармакологических тестов согласно

приказу Минздрава России № 281 от 30.04.2013; использованием современных высокочувствительных аналитических методов (масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой, высокоэффективная жидкостная хроматография, иммуноферментный анализ), проведением исследований в аттестованных лабораториях, что обеспечивает необходимую точность измерений; использованием адекватных поставленным задачам непараметрических принципов обработки статистических совокупностей (U-критерий Манна-Уитни, метод ранговых корреляций Спирмена); личным участием автора во всех этапах работы, обработки, анализа и интерпретации полученных данных.

**Внедрение результатов исследования.** Результаты исследования используются в учебном процессе на химико-биологическом факультете ОГУ при подготовке бакалавров, специалистов, магистров и кадров высшей квалификации по направлению 06.00.00 и в работе лаборатории металломики Института биоэлементологии (акт внедрения № 145 от 19.12.2023), в ФНЦ БСТ РАН при подготовке магистров и кадров высшей квалификации по направлению 36.00.00 (акт внедрения № 01-01-27/460 от 29.08.2023).

**Апробация результатов исследования.** Основные материалы диссертации изложены на III Всероссийской научно-практической конференции «Физиология человека» (Чебоксары, 2020), Всероссийской конференции с международным участием, посвящённой 95-летию Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург, 2020), V Международной научно-практической конференции «Биоэлементы» (Оренбург, 2021), III Объединённом научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов, VII Съезде физиологов СНГ, VII Съезде биохимиков России, X Российском Симпозиуме «Белки и пептиды» (Сочи, 2021), 45-ом Конгрессе Федераций Европейских Биохимических Обществ «FEBS Open Bio» (Любляна, Словения, 2021), XIX Симпозиуме с международным участием «Эколого-физиологические проблемы адаптации» (Казань, 2022); IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Агаджаньяновские чтения» (Москва, 2023); XXIV Съезде Российского Физиологического Общества им. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, 2023).



**Соответствие содержания диссертации паспорту специальности.**

Направление диссертационного исследования соответствует п. 1 – закономерности и механизмы поддержания постоянства внутренней среды организма; п. 5 – организация, динамика и специфика физиологических процессов на всех стадиях развития организма; п. 8 – физиологические основы высшей нервной деятельности у животных и психической деятельности человека (механизмы обучения, памяти, эмоций, сознания, речи, организации целенаправленного поведения и др.); п. 10 – закономерности и механизмы адаптации организма к факторам внешней среды (географическим, экологическим, социальным / зоосоциальным) паспорта специальности 1.5.5. – Физиология человека и животных (биологические науки).

**Публикации.** Всего по материалам диссертации опубликовано 19 научных работ, в том числе 1 в журнале К1 и 3 в журналах К2, входящих в перечень изданий, рекомендуемых ВАК РФ для опубликования материалов докторских и кандидатских диссертаций и 6 в журналах, входящих в перечень изданий Scopus и Web of Science, зарегистрирован 1 патент.

**Личный вклад автора.** Автором лично разработан дизайн исследования, проведены эксперименты на животных и получены первичные данные. Изучены зарубежные и отечественные источники литературы. Автором самостоятельно осуществлена статистическая обработка данных, написание текста диссертации и статей в журналы. Автором сформулированы основные положения, выводы и подготовлена диссертационная работа. В целом, личный вклад автора в выполнение исследования составил 90 %.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 190 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа иллюстрирована 33 рисунками и 21 таблицей. Указатель литературы содержит 120 отечественных и 260 зарубежных источников.

# ГЛАВА 1. СИСТЕМНО-БИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛИ МАРГАНЦА В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

## 1.1 Физико-химическая характеристика марганца

Соединения марганца были известны человечеству еще задолго до его открытия, однако впервые данный металл был открыт в 1774 году шведским фармацевтом и химиком К.В. Шееле. В том же году химик Дж.Г. Ган выделил его при нагревании диоксида марганца ( $MnO_2$ ) со смесью угля и нефти (Blanc P.D., 2018).

Для более глубокого понимания биологических свойств марганца в организме человека и животных для начала необходимо рассмотреть некоторые физико-химические характеристики данного металла.

Марганец (лат. *Manganum*, Mn) является переходным металлом серебристо-белого цвета, который по содержанию в земной коре занимает двенадцатое место среди всех элементов и третье среди переходных металлов, уступая железу и титану (Kretsinger R.H. et al., 2013). Mn относится к 4-му периоду VII группы периодической системы химических элементов Д.И. Менделеева. Данный металл является d-элементом, благодаря чему его окислительные состояния варьируют от  $-3$  до  $+7$  (Третьякова Ю.Д. и др., 2007; Василевская Е.И. и др., 2019).

В природе Mn не встречается в чистом виде и представлен в виде неорганических и органических соединений, при этом преобладают неорганические формы (оксиды, особенно  $MnO_2$  и  $Mn_3O_4$ , а также карбонаты и силикаты) (Ghosh S.K., 2020). Как правило, образуются соединения со степенями окисления  $+2$ ,  $+4$ ,  $+7$ . Помимо этого, благодаря возможности спаривания d-электронов под действием лигандов сильного поля создаются условия для образования отрицательных степеней окисления  $-3$ ,  $-2$ ,  $-1$  в карбонильных и нитрозильных производных (Третьякова Ю.Д. и др., 2007).

В биологических системах преобладают формы Mn со степенью окисления +2 и +3, а также +4. Следует отметить, что другие комплексы Mn в организме человека и животных не встречаются (Avila D.S. et al., 2013). Вероятность образования в организме анионных форм незначительна из-за очень выраженных их окислительных свойств (Улахович Н.А. и др., 2012).  $Mn^{2+}$  является химически более стабильным по сравнению с  $Mn^{3+}$ . В состоянии окисления +2, Mn включается в металлоферменты, такие как супероксиддисмутаза, аргиназа, глутаминсинтетаза и пируваткарбоксилаза. Вследствие химического сходства данный ион может замещать в ферментах ионы  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  и  $Fe^{2+}$  (Li Y.V. and Zhang J.H., 2012; Ye Q. et al., 2017; Li L. et al., 2018). Подобно железу,  $Mn^{2+}$  может быть окислен до  $Mn^{3+}$  с помощью белка церулоплазмينا (Jursa T. and Smith D.R., 2009). В состоянии окисления +3, Mn является мощным окислителем, который, как правило, образует комплексы с белками, например, с трансферрином (Smith M.R. et al., 2017). Если  $Mn^{3+}$  не стабилизируется в комплексе с лигандом, то в таком случае он подвергается реакции диспропорционирования с образованием  $Mn^{2+}$  и  $Mn^{4+}$  (Horning K.J. et al., 2015).

В качестве лигандов Mn могут выступать как высокомолекулярные, так и низкомолекулярные соединения (Michalke V. et al., 2015; Нотова С.В. и др., 2020). Ряд исследователей показывает, что Mn сыворотки крови в основном связан с соединениями с высокой молекулярной массой, такими фракциями как трансферрин (Mn-Tf) и в меньшем количестве с фракцией  $\alpha$ -2-макроглобулина (Michalke V. et al., 2013; Neth K. et al., 2015). Помимо перечисленного, исследователями были обнаружены соединения Mn-цитрата, Mn-гистидина, Mn-фумарата, Mn-малата, Mn-оксалацетата, Mn-альфа-кето-глутарата и Mn-аденозина и неорганического Mn (Michalke V. et al., 2007; Michalke V. and Fernsebner K., 2014).

Таким образом, целый спектр белков и лигандов выступает в качестве носителей Mn.

## 1.2 Влияние марганца на основные функции и физиологические процессы организма

В последние годы происходит интенсивное изучение биологической роли Mn и клинического использования данных о его валовом содержании и распределении по металл-лигандным формам в организме человека и животных для поиска новых подходов комплексного лечения и профилактики многих заболеваний, связанных как с дефицитом, так и с избыточным накоплением в организме.

Эссенциальная роль Mn впервые была описана в 1931 году – учеными было показано влияние данного химического элемента на процессы роста и развития животных, а также состояние их здоровья (Kemmerer A.R. et al., 1931; Underwood E.G., 1977). Однако первые данные о биологической роли Mn для организма человека появились только в 1972 году, когда был выявлен марганецзависимый диабет (Dolsey E.A., 1972). За прошедшее время в научной литературе появилось большое количество информации, подтверждающей эссенциальность данного микроэлемента, поддерживающего различные физиологические функции в организме путем участия в регуляции целого ряда биохимических процессов (Zoroddu M.A. et al., 2019; Erikson et al., 2019).

Биологическая роль Mn в организме связана, главным образом, с работой марганецсодержащих металлоферментов (таблица 1). Как известно, металлоферменты представляют собой энзимы, для каталитического действия которых необходимы ионы переходных металлов (Улахович Н.А. и др., 2012). Металлоферменты Mn представляют собой небольшую группу, среди которых наиболее хорошо изученными и описанными являются марганец-зависимая супероксиддисмутаза, аргиназа, пируваткарбоксилаза и глутаминсинтетаза (Lv M. et al., 2020).

Марганец-зависимая супероксиддисмутаза (Mn-SOD/СОД<sub>2</sub>, КФ 1.15.1.1) является ключевым антиоксидантным митохондриальным ферментом, который защищает клетки от свободно-радикального окисления. Данный фермент

катализирует реакцию дисмутации супероксидного анионного радикала до перекиси водорода и молекулярного кислорода, тем самым регулируя окислительно-восстановительный статус клеток и образование активных форм кислорода (АФК) (Horning K.J. et al., 2015). Благодаря работе данного фермента сохраняется стабильность структур клеточных мембран (Узбеков М.Г., 2016; Azadmanesh J. et al., 2021). Следует отметить, что СОД2 играет важную роль в клеточном функционировании метаболически активных тканей, особенно нейронов головного мозга. В экспериментах на лабораторных животных было показано, что при отключении гена *Sod2* наблюдалось развитие апоптоза нейронов и процессов нейродегенерации (Palma F.R. et al., 2020).

Аргиназа (АРГ, К.Ф.3.5.3.) представляет собой также марганецсодержащий фермент, регулирующий выведение аммиака из организма путем катализа реакции превращения L-аргинина в L-орнитин и мочевины (Косенок В.К. и др., 2016). Метаболическая роль аргиназ заключается не только в детоксикации продуктов катаболизма белков, они также оказывают свое биологическое действие через нижележащие метаболиты, которые образуются из L-орнитина – L-пролин и полиамины (Caldwell R.W. et al., 2018). Более того, учеными была показана важность аргиназ для правильного функционирования нервной системы – они также незаменимы для детоксикации аммиака в головном мозге и важны для регуляции биосинтеза полиаминов, необходимых для роста, развития и регенерации нейронов (Clemente G.S. et al., 2020). Известно, что полиамины оказывают влияние на развитие мозга, скорость регенерации периферических нервов, нейритогенез и выживание нейронов (Березов Т.Т. и др., 2012; Rieck J. et al., 2022). Кроме того, исследователи считают, что данный фермент обладает нейропротекторным действием. Сообщалось, что снижение уровня аргинина в результате реакции гидролиза, катализируемой аргиназой, способствует выживанию нейронов (Horning K.J. et al., 2015). Это связано с тем, что аргинин также является субстратом, способным выделять гуанидиновую группу, в результате чего он может быть преобразован в оксид азота (NO) под действием фермента синтетаза оксида азота (NO-синтетаза). Несмотря на то, что NO

является важным нейромедиатором, его избыточное количество оказывает токсическое воздействие на сигнальные молекулы клеток с последующим повреждением нейронов и развитием различных нейродегенеративных нарушений, включая, болезнь Паркинсона и Альцгеймера (Hannibal L., 2016; Ghasemi M. et al., 2018; Nakamura T. and Lipton S.A., 2020).

Пируваткарбоксилаза (ПК, КФ 6.4.1.1.) является марганец-зависимым ферментом, контролирующим уровень глюкозы путем катализа реакции превращения пирувата в оксалоацетат, что является важным этапом глюконеогенеза и цикла трикарбоновых кислот (Hidalgo J. et al., 2021). Учеными было показано, что в условиях дефицита Mn снижается активность данного фермента и отмечается повышение уровня глюкозы и инсулина, изменение индекса HOMA-IR; на фоне гипергликемии развивается оксидативный стресс в скелетных мышцах и отмечается дисфункция симпатической нервной системы (Скальная М.Г. и Скальный А.В., 2015; Baly D.L. et al., 1985; Rodriguez-Rodriguez E. et al., 2011; Matyal R. et al., 2014). Интересно отметить, что данный фермент является специфичным для астроцитов. Из промежуточных компонентов, таких как оксалоацетат могут быть синтезированы нейромедиаторы (Schousboe A. et al., 2019). Таким образом, данный факт подчеркивает важность работы пируваткарбоксилазы для центральной нервной системы.

Глутаминсинтетаза (ГС, КФ 6.3.1.2) является ключевым ферментом глутамат-глутаминового цикла, который экспрессируется в астроцитах и участвует в метаболизме азота, кислотно-щелочном гомеостазе и передаче сигналов в клетках млекопитающих. Одна из основных ролей глутаминсинтетазы заключается в превращении глутамата и аммиака в глутамин (Jayakumar A.R. and Norenberg M.D., 2016). Данная реакция является биологически значимой, поскольку высокие концентрации данных соединений токсичны для центральной нервной системы (Eid T. et al., 2012). Глутаминсинтетаза головного мозга напрямую вовлечена в патогенез неврологических расстройств и психических состояний (Parageorgiou I.E. et al., 2018; Verhoog Q.P. et al., 2020).

Помимо этого, Mn действует как активатор различных классов ферментов – гидролаз, киназ, лиаз и трансфераз (Цыган В.Н., 2013). Мевалонаткиназы и фарнезилпирофосфатсинтазы катализируют образование предшественника холестерина – сквалена, который оказывает воздействие на липидный и стероидный обмен; гликозилтрансферазы и ксилозилтрансферазы принимают участие в синтезе гликозаминогликанов в костях и хрящах; дейодиназы регулируют функцию щитовидной железы (Malik V. and Black G.W., 2012; Tricarico P.M. et al., 2015; Park J. et al., 2017). Следует отметить, что активация ферментов с помощью Mn в данном случае неспецифическая, а, следовательно, он может быть заменен другими ионами металлов (Smethurst D.G.J. and Shcherbik N., 2021). Тем не менее, необходимы дополнительные исследования для выявления полного набора Mn-зависимых ферментов в системах млекопитающих.

Отмечается, что марганецсодержащие ферменты могут быть использованы в качестве биомаркеров для оценки марганцевого статуса организма. Например, в исследованиях сообщалось, что активность аргиназ печени и эндотелиальных клеток отражает дефицит Mn. Так у крыс, получавших в течение 21-го дня рацион с дефицитом Mn, активность печеночной аргиназы была ниже, чем у контрольной группы (Brock A.A. et al., 1994). В исследованиях американских ученых, было отмечено ингибирование активности аргиназ в эндотелиальных клетках аорты на фоне получения Mn-дефицитной диеты (Ensunsa J.L. et al., 2004). В связи с этим, в рамках проводимой диссертационной работы было исследовано несколько металлоферментов в качестве маркеров для оценки воздействия Mn.

Появляются новые данные о том, что значение Mn в биологических системах не ограничивается ферментативным катализом. Было показано, что фосфатные и лактатные комплексы Mn обладают антиоксидантными свойствами (Qi H.Z. et al., 2020; Dai Y. et al., 2021). Однако большая часть подобных данных была получена в результате изучения бактериальных и дрожжевых систем, но вполне возможно, что такие марганцевые комплексы присутствуют и в многоклеточных организмах. Учеными было установлено, что накопление Mn у

нематод *C. elegans* повышает их устойчивость к окислительному стрессу и увеличивает продолжительность жизни (Gaidamakova E.K. et al., 2022).

Таблица 1 – Функциональная роль марганца в организме человека и животных, опосредованная работой марганецсодержащих и марганецзависимых ферментов

Название фермента	Катализируемая реакция	Функция
Супероксиддисмутаза-2	$2\text{H}^+ + 2\text{O}_2^- \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$	Антиоксидантная защита
Пируваткарбоксилаза	Пируват $\rightarrow$ Оксалоацетат	Углеводный обмен – участие в глюконеогенезе; поддержание физиологической концентрации оксалоацетата, который используется для синтеза нейромедиаторов
Глутаминсинтетаза	Глутамат + $\text{NH}_3 \rightarrow$ Глутамин	Детоксикация свободного аммиака в тканях; регулирование концентрации и компартиментализации пулов нейромедиаторов (глутамат)
Аргиназа	Аргинин + $\text{H}_2\text{O} \rightarrow$ Орнитин + Мочевина	Детоксикация аммиака; орнитин используется для синтеза полиаминов, необходимых для роста, развития и регенерации нейронов
Мевалонаткиназа, Фарнезилпирофосфат-синтаза	Мевалонат $\rightarrow$ 5-фосфомевалоната $\rightarrow$ 5-пирофосфомевалонат	Липидный обмен – участие в синтезе предшественников холестерина
Дейодиназа	Тироксин $\rightarrow$ Трийодтиронин	Участвует в активации/деактивации гормонов щитовидной железы
Гликозилтрансферазы, ксилозилтрансферазы	Гликозилирование белков и липидов, синтез гликозамингликанов (гиалуроновая кислота, хондроитинсульфат)	
Серин/треонинфосфатаза	Дефосфорилирование остатков серина и треонина в молекулах белков, важный механизм передачи сигналов, клеточный цикл и апоптоз	

Таким образом, Mn входит в структуру ключевых ферментных систем центральной нервной системы, участвует в функционировании ферментативного



звена антиоксидантной защиты организма, энергетическом обмене, поддержании функции опорно-двигательного аппарата, иммунной и репродуктивной систем, а также в процессах детоксикации, в частности аммиака, и других важных физиологических функциях организма (Радыш И.В. и др., 2017).

Рассматривая профицитные и дефицитные состояния, важно отметить, что дефицит Mn является довольно редким отклонением в минеральном обмене человека и животных. Для большинства людей получение Mn с продуктами питания обычно обеспечивает необходимые потребности в данном микроэлементе (Aschner J.L. and Aschner M., 2005; Aschner M. and Erikson K., 2017). В основном возникновение дефицитных состояний связывают с повышенной психоэмоциональной нагрузкой на организм, за счет чего усиливается расход данного металла для обеспечения нейрохимических процессов в центральной нервной системе (Скальный А.В. и др., 2004; Тармаева И.Ю. и Боева А.В., 2014). Установлено, что дефицит Mn связан с нарушениями роста и развития организма, нарушением формирования костной и хрящевой тканей, нарушением толерантности к глюкозе, снижением фертильности, а также отражается на функциях головного мозга (Kimura M., 2016; Rondanelli M. et al., 2021; Balasundaram P. et al., 2022; Studer J.M. et al., 2022).

В то время как дефицит Mn довольно редко встречается у человека, его повышенное содержание в организме более распространено, что связано, в первую очередь, с антропогенной деятельностью. Вопреки своим физиологическим свойствам, повышенный уровень Mn способен оказывать токсические эффекты, в особенности, на центральную нервную систему, репродуктивную, сердечно-сосудистую и иммунную системы (Peres T.V. et al., 2016; Sun Y. et al., 2020; Budinger D. et al., 2021).

### **1.3 Источники марганца, пути его поступления в организм**

*Продукты питания.* Пища и питьевая вода являются основным промежуточным звеном в поступлении Mn в организм человека и животных из

окружающей среды, в значительной степени определяющими состояние его минерального обмена (Тутельян В.А. и Самсонова М.А., 2002). Mn содержится в различных пищевых продуктах, включая рис, орехи, цельные зерна, листовые зеленые овощи, шоколад, морепродукты, фрукты и семена. Концентрация Mn в них достигает до 30 мг/кг (Martins A.C.Jr. et al., 2020). В сравнение, продукты животного происхождения, например, мясо и молочные продукты, содержат гораздо меньшие концентрации – 0,2-0,5 мг/кг (Li Y.V. and Zhang J.H., 2012). Следует отметить, что содержание Mn в продуктах питания может различаться в разных странах и регионах. Однако, благодаря такому достаточно высокому уровню содержания Mn в широком спектре пищевых продуктов, человек получает необходимую суточную дозу без труда. Исследования М.Г. Скальной показали, что среднее поступление Mn с рационами питания у населения России составляет около 5 мг/сут (2005).

Следует отметить, что адекватный уровень потребления (АУП) Mn для взрослых составляет 2 мг/сут. Уровень, приводящий к дефициту и порог токсичности Mn, составляет 1 и 40 мг/сут, соответственно (МР 2.3.1.0253-21. 2.3.1.). При этом ученые отмечают, что потребность в Mn зависит от возраста и пола. Согласно рекомендациям Национальной академии наук США, для взрослых женщин наиболее оптимальный уровень потребления Mn составляет 1,8 мг/сут, а для мужчин – 2,3 мг/сут. Разница объясняется более низкими концентрациями ферритина в сыворотке крови у мужчин по сравнению с женщинами. АУП были также установлены и для других возрастных групп населения (рисунок 1) (Avila D.S. et al., 2013).

В последние годы Mn активно используется в минерально-витаминных комплексах и биологически активных добавках (БАД) для лечения и профилактики различных заболеваний, что также вносит заметный вклад в минеральный статус человека. Как правило, препараты, обогащенные Mn, содержат в среднем от 2 до 20 мг данного элемента и даже большие концентрации (до 40 мг) при лечении остеоартрита и остеопороза, несмотря на установленные

рекомендации (Ребров В.Г. и Громова О.А., 2008; Freeland-Graves J.H. et al., 2016; Balachandran R.C. et al., 2020).

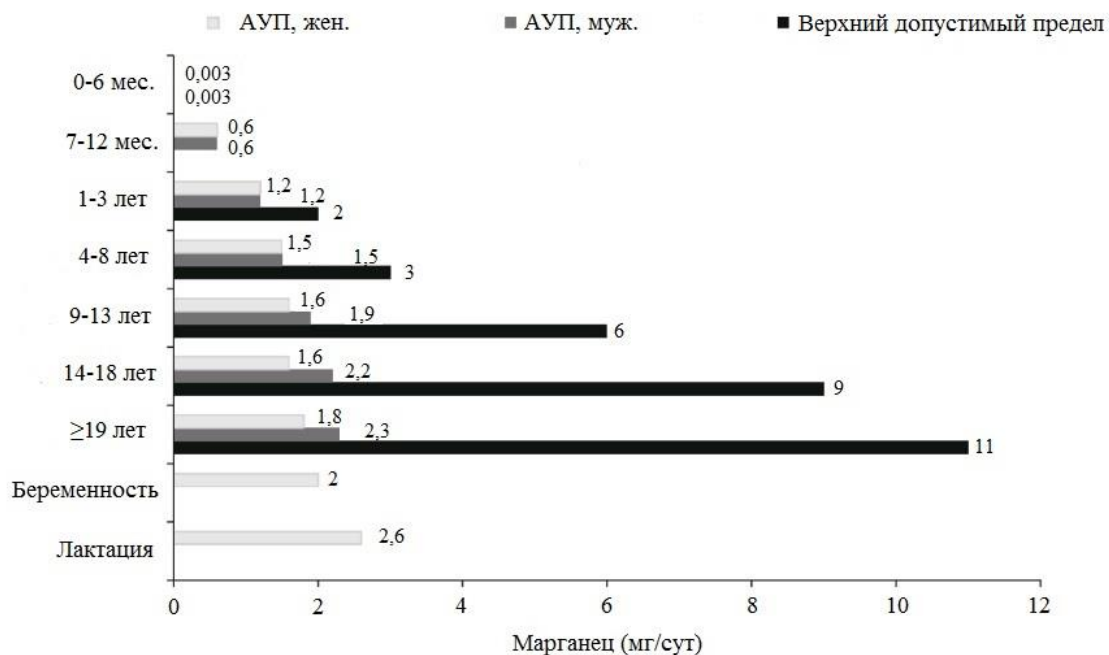


Рисунок 1 – Адекватные уровни потребления и верхний допустимый предел марганца в зависимости от возраста и пола

Следует отметить, что материнское молоко в период грудного вскармливания также является источником Mn, концентрация которого составляет примерно 3-6 мкг/л (Klein L.D. et al., 2017). Однако смеси детского питания содержат колоссально высокие концентрации данного нутриента. В одном из исследований было показано, что диапазон концентраций Mn в детских смесях составлял 160-2800 мкг/л, что значительно выше, чем средняя концентрация Mn в грудном молоке человека (Frisbie S.H. et al., 2019). Данный факт вызывает опасения у ученых о возможных неблагоприятных последствиях, учитывая высокую чувствительность развивающегося мозга к Mn (Scher D.P. et al., 2021).

*Питьевая вода.* Поступление Mn с водой значительно ниже, чем с пищей. Вода, как правило, содержит следовые количества Mn, концентрация которого составляет в среднем от 0,0001 до 0,1 мг/л, при этом в большинстве источников содержание данного металла не превышает 0,1 мг/л (Horning K.J. et al., 2015).

Представленные источники Mn обычно не оказывают критичного воздействия на организм, за исключением особых регионов с повышенными уровнями Mn. Практически все поверхностные источники водоснабжения в последние годы подвергаются антропогенному и техногенному воздействию, что может изменять элементный состав воды. По данным информационного бюллетеня, содержащего результаты работ по мониторингу состояния подземных вод, за период с 2019 по 2022 года на территории Российской Федерации (РФ) отмечают аномальные гидрогеохимические провинции, в которых наблюдается несоответствие качества подземных вод нормативным требованиям к питьевым водам по Mn. Превышение предельно допустимых концентраций (ПДК) (0,1 мг/л согласно СанПиН 2.1.4.1074-01 и ГН 2.1.5.1315-03) Mn было отмечено на отдельных участках Северо-Западного, Центрального, Южного, Северо-Кавказского, Приволжского, Уральского, Сибирского и Дальневосточного федеральных округов.

Согласно данным Центра государственного мониторинга состояния недр и региональных работ, в Ленинградской области и на территории г. Санкт-Петербурга отмечалось превышение ПДК до 7,7 раз на водозаборах питьевого и сельскохозяйственного назначения. Во Владимирской области (г. Суздаль) отмечалось превышение содержания Mn в 21 раз. На территории Московской области и г. Москвы интенсивность загрязнения вод Mn превышала ПДК в 10 раз. По результатам гидрохимического опробования вод Волгоградской области (г. Волгоград, г. Суровикино, г. Урюпинск) наблюдалось повышенное содержание Mn – превышение ПДК в 1,8 раза. Максимальная интенсивность загрязнения подземных вод Mn была выявлена в Оренбургской области на участке Джусинского месторождения меди (ЗАО «Ормет») – превышение ПДК составляло в 74 раза. В Иркутской области интенсивность загрязнения подземных вод в пределах промышленных агломераций была также достаточно высокая – превышение ПДК достигало до 100 раз. В Кемеровской области в зоне влияния промышленных и бытовых отходов (ООО «Полигон М») в подземных водах отмечалось превышение допустимых концентраций Mn в 39 раз. В Сахалинской

области на самом крупном централизованном водозаборе «Луговое» было отмечено превышение содержания Mn в 21 раз.

Основными источниками загрязнения являлись предприятия металлургической, химической и других отраслей промышленности, полигоны промышленных и бытовых отходов, а также не следует исключать природное происхождение металла.

Таким образом, данные мониторинга показали, что содержание Mn в воде не соответствует нормам во многих субъектах РФ. Следует отметить, что в России, как и во многих странах мира, значительная часть питьевой воды из подземных вод потребляется без предварительной очистки, в особенности это касается сельской местности. Следовательно, использование воды с повышенным содержанием Mn для питьевого и сельскохозяйственного назначения вызывает опасения о возможном воздействии на состояние здоровья населения.

*Воздух.* Атмосферный воздух является еще одним источником Mn. Естественным образом Mn попадает в воздух в результате ветровой эрозии почв (Li Y.V. and Zhang J.H., 2012). Однако существенный вклад вносит антропогенная деятельность человека. Как известно, Mn является широко применяемым металлом в различных отраслях промышленности, главным образом, в черной и цветной металлургии, а также строительной, топливной и пищевой промышленности, в медицине и сельском хозяйстве (Fernández-Olmo I. et al., 2021; Liu X. and Rong P., 2021). В связи с этим, добыча Mn и производство его сплавов довольно востребованы по всему миру (Zhuchkov V.I. et al., 2019). При добыче марганцевых руд, производстве ферросплавов теряется до 50 % Mn, что ведет к увеличению концентрации данного металла в атмосферном воздухе (Dashevskii V.Y. et al., 2019). Загрязнение воздуха считается одной из наиболее серьезных экологических проблем в связи с прямым его воздействием на экосистемы и здоровье человека. Таким образом, население, особенно беременные женщины и дети, проживающее в непосредственной близости к промышленным и сельскохозяйственным источникам, могут подвергаться более высокому риску воздействия Mn. В литературе содержится масса примеров о

неблагоприятных эффектах воздействия Mn при ингаляционном поступлении в организм человека (Зайцева Н.В. и др., 2013; Kornblith E.S. et al., 2018).

Следует отметить, что согласно данным федерального информационного фонда социально-гигиенического мониторинга в субъектах РФ наблюдается снижение уровня загрязнения воздуха в городах с предприятиями различных отраслей промышленности; городских территориях, расположенных в зонах влияния автомагистралей и сельских территориях за период 2010-2020 года. Однако, по данным Росприроднадзора, общий объем выбросов Mn и его соединений в атмосферу стационарными источниками с 2015 по 2020 год увеличился. Несмотря на это, средние и средние из максимальных концентраций Mn по городам России находятся в пределах нормы. Превышение ПДК в воздухе представлено единичными случаями. Наибольшая средняя за месяц концентрация Mn была отмечена в г. Кстово, превышавшая ПДК в 1,2 раза. В соответствии с данными государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации», были зарегистрированы превышения среднесуточной ПДК в городах Нижний Тагил и Челябинск.

*Почва.* Почва также является естественным источником Mn для человека. Его содержание в почве зависит от окислительно-восстановительного потенциала, реакции среды, влажности и уровня плодородия почв (Побилат А.Е. и Волошин Е.И., 2017). Почвы, образовавшиеся в результате эрозии пород земной коры, как правило, содержат 40-900 мгMn/кг с максимальным содержанием до 4000 мгMn/кг (Li Y.V. et al., 2012).

Загрязнение почвы тяжелыми металлами создает риск токсического воздействия на организм. Почва является связующим элементом круговорота веществ в системе почва – растения – животные – человек (Стифеев А.И. и др., 2015). В связи с этим, загрязнение почв может приводить к миграции металлов в поверхностные и подземные воды, а также поглощаться растениями и далее по пищевым цепям проникать в организм, оказывая негативный эффект на здоровье населения (Сембаев Ж.Х. и др., 2019; Маршинская О.В. и др., 2021).

Считается, что загрязненный атмосферный воздух является основным источником поступления тяжелых металлов в почву. В связи с этим наблюдения за загрязнением почв металлами проводятся, в основном, в районах, в которых расположены предприятия цветной и чёрной металлургии, машиностроения и металлообработки, топливной и энергетической, химической и нефтехимической промышленности, предприятий по производству стройматериалов (Васильев А.А. и Чащин А.Н., 2011; Черногаева Г.М. и др., 2020, 2021, 2022).

Согласно ежегодным обзорам состояния почв, оценка содержания в почвах тяжелых металлов и других токсикантов проводилась на территориях Центрального, Дальневосточного, Сибирского, Уральского и Приволжского федеральных округов.

Анализ почв Московской, Иркутской, Кемеровской, Новосибирской, Омской, Томской, Оренбургской и Самарской областей показал, что валовое содержание Mn в почве не превышало значения ПДК, однако было отмечено превышение значений фоновых концентраций. Результаты анализа Свердловской области показали, что в отдельных точках пробоотбора концентрация Mn была выше ПДК в 1,5-2,5 раза. Было выявлено загрязнение почв Mn в городах – Нижний Тагил (превышение ПДК в 6 раз), Ижевск (превышение ПДК в 1,9 раз), Нижний Новгород (превышение ПДК в 1,2 раза), а также в поселке городского типа Приморского края Славянка (превышение ПДК в 3,1 раз) (Черногаева Г.М. и др., 2020).

Таким образом, согласно результатам, полученным при наблюдениях за загрязнением почв веществами промышленного происхождения, превышение предельно допустимых Mn в почвах наблюдалось в единичных случаях. Однако анализ данных государственного мониторинга почв и других систем наблюдений за состоянием окружающей среды показывает, что практически во всех субъектах РФ наблюдается ухудшение земель.

*Пыль.* Пыль наряду с продуктами питания и питьевой водой также является еще одним из источников Mn (Катола В.М. и Комогорцева В.Е., 2018). Крупные и ультрадисперсные частицы Mn, которые образуются при производстве

ферромарганцевых сплавов, способны распространяться на расстояния от нескольких метров до нескольких километров, оседая вместе с пылью (Rodrigues J.L.G. et al., 2018). Помимо этого, использование фунгицидов в сельском хозяйстве, таких как манеб и манкоцеб, содержащих в своем составе до 21 % Mn, также способствуют образованию пыли с высоким содержанием данного металла (Gunier R.B. et al., 2014).

По этой причине, осевшая пыль представляет собой еще один дополнительный источник Mn. Однако, какую опасность это несет для здоровья человека еще не до конца изучено. Этот путь воздействия был довольно хорошо описан для свинца (Pb). Было установлено, что бытовая пыль работает, как среда для осаждения тяжелых металлов и является одним из путей их воздействия на организм, особенно на детей, за счет проглатывания и вдыхания ее мельчайших частиц (Tan S.Y. et al., 2016; Aguilera A. et al., 2021; Shi T. and Wang Y., 2021). В нескольких исследованиях сообщалось, что высокий уровень Pb в пыли жилых и школьных помещений, а также в пыли открытых игровых площадок приводил к повышению его уровня в крови у детей дошкольного и школьного возраста (Glorennec P. et al., 2012; Zota A.R. et al., 2016; Braun J.M. et al., 2021). Сообщается, что анализ пыли может служить показателем загрязнения помещений и может предоставить ценную информацию для оценки воздействия тяжёлых металлов на человека в помещениях (Cao S. et al., 2022).

Таким образом, Mn поступает в организм следующими основными путями: алиментарный путь – через желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) с продуктами питания и питьевой водой (воднопищевой путь); ингаляционный путь с вдыхаемым воздухом и пылью; через кожу и слизистые. Следует отметить, что поступление Mn через кожу встречается наиболее редко и связан в основном с производственным процессом (Тихонов М.Н. и Цыган В.Н., 2010; Nriagu J., 2019; Firth J. et al., 2020).

Подводя итог, можно заключить, что поражение тех или иных систем органов человека находится в прямой зависимости от состояния окружающей среды, уровня и характера ее загрязнения. Следует отметить, что во многих



исследовательских работах Mn не рассматривается в качестве потенциального техногенного поллютанта, а, следовательно, не изучается его вклад в общетоксическую нагрузку на население, ведь, как правило, отдается предпочтение изучению эффектов Pb, Hg, Cd и As (Рафикова Ю.С. и др., 2020; Kim D.W. et al., 2021; Moon M.K. et al., 2022). Исходя из представленных данных, несмотря на то, что в течение последних нескольких десятилетий были приняты строгие меры контроля уровня тяжелых металлов в атмосфере, высокие уровни Mn продолжают оставаться в водных объектах и почвах, а, следовательно, и в пищевой цепи, оказывая неблагоприятное влияние на все слои населения вследствие хронического воздействия.

#### 1.4 Особенности метаболизм марганца

Содержание Mn в организме подвергается строгому гомеостатическому контролю, благодаря чему его концентрация поддерживается на очень низком, но достаточном для обеспечения физиологических функций уровне. Организм взрослого человека содержит от 12 до 20 мг Mn (Радыш И.В. и др., 2017; Balachandran R.C. et al., 2020).

Поглощение Mn в первую очередь зависит от пути его поступления.

*Всасывание в кишечнике.* Около 5 % Mn, содержащегося в рационе, всасывается на всем протяжении тонкого кишечника в виде ионов  $Mn^{2+}$  и  $Mn^{4+}$  путем пассивной диффузии или активного транспорта (Bai S.P. et al., 2008; Ye Q. et al.; 2017). Следует отметить, что у новорожденных и детей абсорбция Mn выше, чем у взрослых (Lucchini R. et al., 2017). Считается, что в основном белок DMT1 осуществляет всасывание марганца в ЖКТ. Примечательно, данный белок осуществляет транспорт, по меньшей мере, еще 8 металлов, включая Fe, Mn, Ni, Co, Cu, Zn (Avila D.S. et al., 2013; Chen P. et al., 2018). Помимо этого, сообщается, что такие белки, как ферропортин, ZIP14 и ZIP8 играют важную роль во всасывании Mn в кишечнике (Fujishiro H. et al., 2012; Seo Y.A. and Wessling-Resnick M., 2015; Boycott K.M. et al., 2015; Tuschl K. et al., 2016).

*Поступление через дыхательные пути.* В зависимости от степени растворимости в воде ингалированных соединений, а также их размера, в системный кровоток всасывается от 40 до 70 % Mn (Lucchini R. et al., 2017; Gandhi D. et al., 2022). Однако молекулярный механизм легочного транспорта до сих пор остается до конца не изученным.

После всасывания в желудочно-кишечном тракте или легких Mn попадает в кровоток в составе высокомолекулярных и низкомолекулярных соединений и распределяется по различным органам и тканям. Валовое содержание Mn в цельной крови у взрослого населения, не подвергающегося профессиональному воздействию, составляет от 3,0 до 8,0 мкг/л, а в сыворотке – от 0,1 до 1,2 мкг/л (Lucchini R. et al., 2017). У женщин, как правило, уровень Mn примерно на 30 % выше, чем у мужчин. Гораздо более высокие уровни фиксируются во время беременности и при рождении (Kim Y., 2017). Mn депонируется в печени (1,2-1,3 мг/кг), поджелудочной железе (1,04 мг/кг), костях (1 мг/кг), почках (0,98 мг/кг), а также в головном мозге (0,15-0,46 мг/кг) (O'Neal S.L. and Zheng W., 2015; Chen P. et al., 2018).

*Экскреция.* Печень является основным органом, участвующим в регуляции гомеостаза Mn во всем организме (Winslow J.W.W. et al., 2020). Более 90 % Mn выводится путем секреции его в кишечник через гепатобилиарную систему. Mn в печени включается через лизосомальные компартменты в желчь и затем выводится с калом. Если желчный путь блокирован или наблюдается перегрузка Mn, то он также может экскретироваться через панкреатическую жидкость (Цыган В.Н., 2013).

Умеренное увеличение потребления Mn с пищей сопровождается компенсаторным снижением его всасывания в кишечнике, увеличением концентрации Mn в печени и повышенным уровнем экскреции с желчью для поддержания нормальных концентраций данного металла в головном мозге и других внепеченочных тканях. Снижение элиминации Mn, например, при холестазах у взрослых или, например, у новорожденных и маленьких детей в связи с более высокой скоростью абсорбции Mn на фоне низкой скорости выведения

из-за недоразвитого желчевыводящего механизма, может привести к накоплению Mn в органах и тканях, включая головной мозг, что увеличивает потенциал его токсичности (Yoon M. et al., 2019; Dastych M. et al., 2021).

Таким образом, основная экскреция Mn осуществляется с калом (до 3,6 мг) независимо от пути его поступления в организм. Доля, выводимая с мочой невелика, и составляет до 6 % (до 0,03 мг) и зависит от ряда индивидуальных факторов (возраст, пол, курение, употребление алкоголя) (Цыган В.Н., 2013).

### **1.5 Функциональное состояние организма на фоне избыточного поступления марганца**

Несмотря на важную роль Mn в поддержании физиологических процессов организма, избыточное воздействие данного металла может оказать неблагоприятный эффект на ряд функциональных систем.

**Марганец и нервная система.** Известно, что именно нервная система определяет целостный характер реакций и многозвеньевые механизмы, которые участвуют в осуществлении адаптационно-компенсаторных процессов организма (Федоров Б.М., 1990). В связи с этим важно более подробно рассмотреть вопрос о роли Mn и его влиянии на нервную систему.

Как ранее было указано, Mn является ключевым элементом ферментов необходимых для работы головного мозга (аргиназа, супероксиддисмутаза, пируваткарбоксилаза, глутаминсинтетаза), принимающих участие в электрофизиологической активности нейронов, защите от окислительного стресса и детоксикации продуктов метаболизма (Скальная М.Г. и Скальный А.В., 2015). Учеными было показано, что не только дефицит, но и избыточное воздействие данного химического элемента может оказать пагубное воздействие на нервную систему.

Исследователями отмечается нарушение когнитивных, познавательных, речевых, поведенческих и двигательных функций, развитие психических и поведенческих расстройств, нейродегенеративных заболеваний (болезнь

Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтона) на фоне избыточного воздействия Mn (Al-Lozi A. et al., 2017; Kornblith E.S. et al., 2018; Martins A.C.Jr. et al., 2019; Joshi P. et al., 2019). Следует отметить, что в структуре функциональных отклонений подобные нарушения занимают лидирующее положение, которые ведут к инвалидизации населения (Шматова Ю.Е., 2019). На сегодняшний день нейротоксические эффекты Mn представляют собой особую опасность в силу того, что данный тяжелый металл способен оказывать свое влияние на все группы населения.

*Профессиональное воздействие.* Токсический эффект Mn на центральную нервную систему впервые был зарегистрирован среди шахтеров, сварщиков, плавильщиков и других рабочих, которые подвергались ингаляционному воздействию данного металла в связи с его использованием в производственных циклах (Mehrifar Y. et al., 2020; Lotz A. et al., 2021). Так самые первые данные о токсических неврологических последствиях воздействия Mn были описаны Джеймсом Купером еще в 1837 году, который зафиксировал паралич нижних конечностей у шотландских рабочих по измельчению марганцевой руды (Blanc P.D., 2018).

В отечественной и зарубежной литературе представлен целый ряд исследований, посвященных изучению профессионального воздействия Mn на здоровье сотрудников, занятых в различных производственных процессах (Некрасов В.И., 2005; Чащин М.В. и др., 2014; Yang H. et al., 2019). В частности, по данным комплексного обследования жителей различных федеральных округов РФ, были выявлены существенные отличия в элементном статусе у лиц, занятых на производстве по сравнению с жителями, занятыми в непромышленной сфере (Скальный А.В. и др., 2012). Был изучен элементный статус работников промышленных предприятий Оренбургской области, являющейся крупным промышленным центром Южного Урала. Было выявлено, что уровень Mn в волосах превышал референтные значения у 34 % обследуемых (Нотова С.В. и др., 2005). У работников горнодобывающей и металлургической компании ОАО «Северсталь» (Вологодская область) наблюдался повышенный уровень Mn в

волосах, накопление которого возрастало с увеличением стажа работы и коррелировало с ростом частоты болезней нервной системы (Скальный В.В. и др., 2006).

По данным метаанализов, было показано, что у рабочих горнодобывающей промышленности, черной и цветной металлургии наблюдаются нарушения нейрокогнитивных и нейроповеденческих функций (Bailey L.A. et al., 2018). В исследовании Brad A. Racette и соавторов, проведенного среди 886 американских работников, было выявлено, что воздействие сварочного дыма, содержащего Mn, может привести к дозозависимому прогрессированию признаков паркинсонизма (брадикинезия, синдром мышечной скованности, нарушение речи) (Racette B.A. et al., 2017). Многие исследователи отмечают нарушения в работе дофаминергической системы у работников промышленных производств (Lin M. et al., 2020; Criswell S.R. et al., 2021)

Таким образом, представленные данные показывают, что воздействие высоких уровней Mn может приводить к нейродегенеративным нарушениям. Исследования в этой области ведутся до сих пор с целью разработки мер по защите, сохранению и укреплению здоровья сотрудников промышленных производств.

*Непрофессиональное воздействие. Взрослое население.* В подавляющем большинстве эпидемиологических исследований было изучено профессиональное влияние Mn на организм. Однако, интересно отметить, что ситуация с воздействием Mn меняется и в противоположность острому профессиональному воздействию увеличивается риск хронического влияния данного металла в относительно низких дозах на все население в целом. Особенно это касается той части населения, которая проживает вблизи промышленных районов и дорог (Martin K.V. et al., 2020). Усугубляет данное положение и нарушение принципов оптимального питания, что приводит к изменениям усвоения химических элементов-микронутриентов организмом (Скальный А.В. и др., 2018). Такие изменения условий отражаются на состоянии здоровья человека и проявляются

функциональными изменениями в различных физиологических системах (Сальникова Е.В. и др., 2019).

По данным аналитического исследования элементного статуса населения страны, проведенного группой специалистов под руководством профессора А.В. Скального, было зарегистрировано отклонение от норм уровня Mn в волосах у различных половозрастных групп жителей многих регионов России. Например, для жителей Вологодской области, занятых в непромышленной сфере, была зафиксирована максимальная в Северо-Западном федеральном округе распространенность случаев избыточного содержания Mn в волосах (у мужчин в возрасте от 25 до 50 лет частота встречаемости повышенного уровня данного металла составляла 46 %). Согласно скринингу, проведенному среди взрослого населения, у женщин и мужчин Ленинградской области, а также женщин республики Коми также наблюдался избыток Mn в волосах (Скальный А.В. и др., 2012). При рассмотрении Центрального федерального округа, было отмечено, что для жителей Московской области, напротив, было характерно относительно низкое содержание Mn в волосах. Авторы объяснили это более низким уровнем потреблением грубой растительной пищи, которая является основным источником Mn. Однако у большинства обследуемых мужчин и женщин Ивановской, Курской и Костромской областей отмечалось избыточное накопление Mn в организме (Скальный А.В. и др., 2011). При рассмотрении Приволжского и Уральского федеральных округов также было выявлено повышенная частота накопления Mn в волосах у мужчин и женщин, занятых в непромышленной сфере (Кировская, Оренбургская, Нижегородская, Ульяновская, Свердловская и Тюменская области, а также Республика Марий Эл и Татарстан) (Скальный А.В. и др., 2013). У жителей Сибирского и Дальневосточного федеральных округов только в некоторых областях была зафиксирована повышенная распространенность избыточного накопления Mn (Республика Алтай, Кемеровская, Омская, Томская и Сахалинская области, Приморский край) (Скальный А.В. и др., 2014). Подобные изменения связаны с эколого-геохимическими факторами и означают выраженное напряжение

адаптационно-приспособительных систем, включая нервную и репродуктивную систему. Это может служить фоном, предрасполагающим к развитию разного рода патологии у местного населения, в том числе и неврологической.

В клинических исследованиях было показано, что у жителей, проживающих в районах, расположенных рядом с заводами по производству ферромарганцевых сплавов, отмечался повышенный уровень Mn в волосах, который коррелировал с показателями низкой зрительной рабочей памяти и когнитивной гибкости, нарушением двигательной функции (Kornblith E.S. et al., 2018; Ruiz-Azcona L. et al., 2021). Следует отметить, что уровень общей заболеваемости психическими расстройствами и расстройствами поведения в представленных регионах был выше, также отмечались более высокие риски осложнений беременности, родов и послеродового периода; увеличение коэффициента ранней неонатальной заболеваемости и смертности, числа врожденных пороков развития (Скальный А.В. и др., 2011, 2012, 2013, 2014).

Таким образом, в районах размещения крупных промышленных предприятий изменение среды обитания человека сопровождается формированием химических аномалий, которые влияют на минеральный обмен не только работников промышленных предприятий, но и населения, не занятого в производстве, тем самым оказывая негативное воздействие на функциональное состояние организма, в частности нервную систему.

*Детское население.* Охрана здоровья детей является одним из приоритетных направлений государственной политики в сфере здравоохранения РФ (Штина И.Е. и др., 2017). В связи с этим, в последние годы все большее внимание учеными уделяется изучению последствий негативного воздействия техногенных факторов на формирование детского организма (Пухова Т.Г. и др., 2022). Как известно, наиболее чувствительными к воздействию факторов окружающей среды являются группы населения со сниженными адаптационными возможностями, к которым, в первую очередь, относятся беременные женщины и дети, особенно в критические периоды их развития (пренатальный, неонатальный, младенчества, младшей школы, пубертатный), что связано с рядом физиологических

особенностей организма. Это напряженность метаболических процессов, обусловленных интенсивным ростом и развитием организма, в сочетании с незрелостью их регуляции – повышенная проницаемость гематоэнцефалического барьера, слизистых оболочек ЖКТ и дыхательных путей; незрелость системного и местного иммунитета, а также систем экскреции (Агаджанян Н.А. и др., 2006). Следует отметить, что в аналогичных регионах РФ была зарегистрирована повышенная распространенность избыточного накопления Mn в волосах детей в возрасте от 3 до 15 лет (Скальный А.В. и др., 2011; 2012; 2013; 2014). Данный факт вызывает опасения по поводу возникновения возможных неблагоприятных эффектов, в особенности, связанных с изменением функционального состояния центральной нервной системы.

*Пренатальный период.* Повышенная чувствительность плода на ранних стадиях онтогенеза к действию тяжелых металлов объясняется его функциональной незрелостью, сниженной реактивностью и недостаточно развитыми механизмами адаптации к меняющимся условиям среды (Кирющенко А.П., 1978; Taouk L. and Schulkin J., 2016). В период органогенеза и плацентации в результате действия факторов внешней среды у эмбриона и плода в первую очередь поражаются органы и системы, которые находятся в данный период в процессе дифференцировки и повышенного обмена веществ (Светлов П.Г., 1960).

Важно отметить, что процессы обмена между организмом матери и плода в значительной степени определяются функцией плаценты. Многочисленные факторы внешней среды, оказывающие повреждающее действие на развитие эмбриона и плода, могут проявить свой эффект путем проникновения через плаценту или в результате изменений ее нормальной проницаемости (Гармашева Н.Л. и Константинова Н.Н., 1978). Учеными было установлено, что в плаценте происходит интенсивное накопление Mn, который путем, преимущественно, активного транспорта поступает в плод и в дальнейшем может стать причиной развития различных хронических заболеваний (Claus Henn B. et al., 2017; Soler-Blasco R. et al., 2020). Также следует отметить, что состояние



плаценты зависит от статуса организма беременной в целом и деятельности ее важнейших органов и систем (Кирющенко А.П., 1978).

Анализ данных отечественной и мировой литературы, посвященной исследованию эмбриотоксических свойств Мп, позволяет прийти к заключению, что данные вопросы значительно лучше изучены в условиях эксперимента. В одном из исследований было показано, что воздействие Мп в период гестации лабораторных животных приводило к истончению коры головного мозга потомства (Parras V.A. et al., 1997). Учеными было установлено, что воздействие Мп на беременных самок крыс с 1 по 10 день гестации, что соответствует эмбриональному и раннему фетальному периодам развития, характеризующихся высоким темпом пролиферации, митотического деления, синтеза белков, привело к аномальному метилированию генов нейромедиаторных систем головного мозга и было ассоциировано с нарушением поведения потомства (Hill D.S. et al., 2015). В экспериментальных работах других авторов было показано, что повышенное воздействие Мп на самок крыс в период с 7-го по 22-й день физиологической беременности, что соответствует плацентарному периоду развития, характеризующийся формированием высшей структуры центральной нервной системы, приводило к повышению содержания данного химического элемента в тканях головного мозга и крови потомства; изменению активности ферментов, принимающих участие в синтезе и гидролизе нейромедиаторов и коррелировало со сниженной способностью к обучению лабораторных животных (Гелашвили О.А., 2008; Batschauer A.R. et al., 2021; Beasley T.E. et al., 2022; Oshiro W.M. et al., 2022). Таким образом, в научной литературе представлены убедительные данные, указывающие на то, что стрессорное воздействие Мп на материнский организм во время физиологической беременности является причиной нарушения морфофункционального развития центральной нервной системы потомства, что приводит к нарушению поведения, расстройству когнитивных функций, а также развитию нейродегенеративных процессов у потомства (Okada M.A. et al., 2016; Batschauer A.R. et al., 2021). В клинических исследованиях коллег из Китая было установлено, что пренатальное воздействие

Mn даже в условиях соблюдения нормативов и наличия в атмосферном воздухе данного металла в значительно меньших концентрациях, чем ПДК характеризовалось нарушением развития нервно-поведенческих функций новорожденных согласно шкале оценки неонатального состояния (Yu X.D. et al., 2014).

Учеными была выдвинута гипотеза о том, что как недостаточный, так и избыточный уровень Mn в крови женщин во время физиологической беременности связан со снижением роста плода. Учеными было обнаружено, что высокий уровень Mn в пуповинной крови был ассоциирован с задержкой внутриутробного развития (Vigeh M. et al., 2008). В ряде исследований была также показана связь между повышенной концентрацией Mn в крови беременных женщин и нарушениями физического развития ребенка – отмечалась более низкая масса тела при рождении (Hu J. et al., 2018; Rager J.E. et al., 2020). Однако полученные данные носят довольно противоречивый характер. В исследованиях других ученых подобных изменений, напротив, зафиксировано не было (Ashley-Martin J. et al., 2018).

Таким образом, нарушение интегрированной системы «мать-плацента-плод» может привести к тяжелым порокам развития. В ранние периоды онтогенеза у эмбриона почти полностью отсутствуют механизмы адаптации и специфические реакции в ответ на действие патогенных агентов. Только по мере созревания важнейших органов и систем плода и становления функций плаценты возникают морфологические и функциональные предпосылки для формирования ответных реакций, характерных для организма новорожденного.

Сообщается, что пренатальное воздействие имеет долговременный эффект на функциональный статус организма (Coussons-Read M.E., 2013). Воздействие повреждающих факторов, в том числе Mn, может нарушить сложный процесс развития организма, заложить основы патологии, которая может проявиться много лет спустя (Сидорова И.С. и Макаров И.О., 2009).

*Постнатальный период.* Учеными также было показано, что нервно-психическое развитие детей дошкольного и школьного возраста также

чувствительно к воздействию Mn. Это проявляется при его воздействии ухудшением когнитивных функций, показателей интеллектуальной деятельности (снижение умственной работоспособности, увеличение количества ошибок в тестах, нарушение логической последовательности выполнения заданий), снижением внимания, повышением тревожности, а также замедлением скорости реакций и нарушением мелкой моторики пальцев (Bouchard M.F. et al., 2018; Conley T.E. et al., 2020). В исследованиях бразильских ученых было установлено, что у детей в возрасте от 7 до 12 лет, проживающих на территориях рядом с заводами по производству ферромарганцевых сплавов, происходило накопление Mn в волосах, что коррелировало с более низкими показателями вербальной памяти и гиперактивным поведением (Carvalho C.F. et al., 2018).

Следует отметить, что молекулярные и клеточные механизмы токсического действия Mn на нервную систему еще до конца не изучены. Учеными было установлено, что Mn способен преодолевать ГЭБ и накапливаться в различных структурах головного мозга, преимущественно в структурах экстрапирамидной нервной системы (участки коры головного мозга, хвостатое ядро, черная субстанция), что приводит к дисбалансу химических элементов в тканях мозга, развитию окислительного стресса и нейровоспаления, нарушению работы нейромедиаторной системы (Miah M.R. et al., 2020; Nyarko-Danquah I. et al., 2020; Soares A.T.G. et al., 2020).

***Марганец и репродуктивная система.*** Mn, являясь кофактором ферментов, участвующих в синтезе холестерина (мевалонаткиназа, фарнезилпирофосфатсинтаза), оказывает воздействие на метаболизм стероидных гормонов (Maciejewski R. et al. 2022). Помимо этого, согласно результатам фундаментальных исследований, ионы данного металла влияют на экспрессию генов, обеспечивающих биологическое действие гипоталамического гонадотропин-рилизинг-гормона (ГнВГ) (Xie J. et al., 2014). Таким образом, дефицит Mn может привести к снижению активности марганецзависимых ферментов, что ограничивает синтез предшественников холестерина, и как следствие, влияет на уровень половых гормонов (Skalnaya M.G. et al., 2015). В

исследованиях было показано, что снижение в крови уровня Mn было ассоциировано со снижением выработки тестостерона и митохондриальной дисфункцией сперматозоидов, с повышенным риском ановуляции, а также высоким риском развития преэклампсии на поздних сроках беременности (Migliaccio O. et al., 2015; Nandakumaran M. et al., 2016; Kim K. et al., 2018).

Однако не менее опасным является избыточное воздействие Mn для репродуктивной системы мужского и женского организма. Экспериментальные данные показали, что Mn нарушает несколько этапов пути биосинтеза тестостерона в клетках Лейдига (Souza T.L, et al., 2020). Учеными также было выявлено повышение уровня ГнРГ и лютеинизирующего гормона (ЛГ) на фоне снижения уровня тестостерона в группе обследованных лиц, подвергшихся повышенному воздействию Mn (Yang H. et al., 2019). Результаты исследований американских ученых показали, что Mn способен накапливаться в жёлтом теле яичника и приводить к образованию большого количества активных форм кислорода, что нарушает прооксидантно-антиоксидантное равновесие и влияет на репродуктивное здоровье женщин (Chao H-H. et al., 2023). Таким образом, избыточное воздействие Mn приводит к нарушению функционирования гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси и изменению гормонального гомеостаза организма, характеризующееся снижением синтеза тестостерона, изменением соотношения ЛГ и ФСГ, влияющих на мужскую и женскую фертильность (Nkraа K.W. et al., 2018).

***Марганец и обмен веществ.*** Экспериментальные и клинические исследования установили зависимость между содержанием Mn в организме и нарушениями обмена веществ (Baj J. et al., 2023; Sun Z. et al., 2023). Учеными было показано, что как при дефиците, так и при избытке Mn в организме человека и животных происходят изменения в углеводном и липидном обменах. В одном из исследований было установлено, что дефицит Mn в рационе лабораторных животных приводит к снижению секреции инсулина, вызывая нарушение углеводного обмена (Baly D.L. et al., 1984).

В литературе представлены также данные о воздействии повышенного воздействия Mn на липидный и углеводный обмены, характеризующиеся изменением показателей липидного спектра (повышение уровня общего холестерина, триглицеридов) и развитием гипогликемизирующего эффекта (повышение уровня глюкозы) (Мазунина Д.Л., 2015). В экспериментальном исследовании у крыс, получавших внутривентрикулярные инъекции Mn, наблюдалась гипергликемия и гипоинсулинемия, за которыми следовала реактивная гипогликемия (Li L. and Yang X., 2018). Авторы также отмечали, что изменение уровня глюкозы и инсулина в крови коррелировало с изменением содержания Mn в печени и поджелудочной железе, что позволяет предположить, что эффекты воздействия Mn на углеводный обмен могут быть обусловлены его прямым влиянием на высвобождение запасов инсулина в кровь и глюконеогенез (Mousavi Z. et al., 2016). Эпидемиологические исследования, проведенные китайскими учеными, показали, что более низкое потребление Mn с пищей связано с более низким риском развития метаболического синдрома (Zhou B. et al., 2016).

Таким образом, в многочисленных работах подчеркивается, что при избыточном воздействии Mn происходят нарушения в функционировании ряда органов и систем, в частности, наблюдается развитие нарушений со стороны центральной нервной системы, репродуктивной системы и системы крови.

### **Резюме**

Таким образом, Mn является жизненно важным микроэлементом и одновременно с этим потенциальным стрессорным фактором, чрезмерное антропогенное воздействие которого может привести к напряжению регуляторных механизмов организма.

В ходе анализа научных исследований отечественных и зарубежных авторов установлена несомненная значимость исследования проблемы, которая остается до сих пор недостаточно изученной – оценка влияния хронического

стресса, обусловленного повышенным воздействием Mn в пре- и гестационный периоды, на здоровье матери и потомства. Существует предположение, что воздействие Mn в период внутриутробного развития может в дальнейшем предрасполагать организм к неврологическим расстройствам и увеличить риск их возникновения, включая паркинсонические нарушения (Michalke V. and Fernsebner K., 2014; Peres T.V. et al., 2015). В этой связи большое значение приобретают методы выявления предпатологических изменений в результате негативного воздействия экологических факторов на организм человека, в том числе и Mn. Как известно, до начала возникновения и развития патологии организм проходит стадию донозологических состояний (Шукуров Ф.А. и Халимова Ф.Т., 2019). Распознавание подобных состояний занимает приоритетное место в современной профилактической медицине, так как их диагностика является основой первичной профилактики болезней и предупреждения перехода предболезни в болезнь.

Таким образом, изучение закономерностей формирования элементного гомеостаза и поведенческих реакций потомства, подвергшихся в период пренатального развития воздействию Mn, определение соответствующих биомаркеров и ранних функциональных изменений позволит нивелировать негативные эффекты Mn, разработать и улучшить профилактические стратегии.

## ГЛАВА 2. ОРГАНИЗАЦИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Организация исследования

Экспериментальное исследование проводилось в условиях экспериментально-биологической клиники Федерального научного центра биологических систем и агротехнологий Российской академии наук, г. Оренбург на самках-крыс (n=80) линии Wistar и их потомстве (n=80). В эксперименте использовались половозрелые животные в возрасте 12-18 недель, что согласно классификации возрастных периодов лабораторных животных, соответствует репродуктивному периоду крыс (Карнищенко Н.Н. и Грачева С.В., 2010). При соотношении возраста экспериментальных животных с возрастом человека было установлено, что он соответствовал зрелому возрасту согласно общепринятой возрастной периодизации онтогенеза (АПН СССР, 1965; Котеров А.Н. и др., 2018; Sengupta P., 2013). Исследования выполнялись в соответствии с протоколами Женевской конвенции «International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals» и принципами надлежащей лабораторной практики (Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009), а также согласно рекомендациям «The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press Washington, D.C. 1996)».

Дизайн эксперимента был одобрен локальным этическим комитетом Федерального научного центра биологических систем и агротехнологий Российской академии наук (№ 4 от 05.02.2019).

Все анализы, включая определение валового содержания элементов, металл-лигандных форм металлов и морфобиохимических показателей крови, в аттестованных лабораториях АНО «Центр биотической медицины» г. Москва (регистрационный номер лицензии Л041-01137-77/00324496), ООО «Микронутриенты» г. Москва (регистрационный номер лицензии Л041-01137-77/00370156) и Испытательного центра ЦКП БСТ РАН (заключение № 2032).

Работа выполнена в рамках гранта на проведение крупных научных проектов по приоритетным направлениям научно-технического развития № 075-15-2024-550.

Для достижения поставленных задач эксперимент проводился в несколько этапов. До начала эксперимента проводилось формирование максимально однородных групп, что соответствовало уравнительному периоду. Цель этого периода – адаптировать животных, уравнивать выделенные группы, осуществить подбор и апробацию вводимой дозы Mn. Животных содержали на основном рационе (ОР) в виде рассыпного комбикорма «Дельта Фидс» («БиоПро», г. Новосибирск) и бутилированной питьевой воде («Святой источник», ООО Аква Стар, г. Кострома) *ad libitum*, при температуре  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$  в пластиковых клетках с подстилкой из древесных опилок в условиях искусственного освещения (12-часовой световой день) и приточно-вытяжной вентиляции (приложение А, таблица А.1, А.2).

*Этап I.* На данном этапе экспериментального исследования самки-крыс в возрасте 12 недель были разделены на контрольную ( $n=40$ ) и опытную ( $n=40$ ) группы. Животные опытной группы в течение 4 недель (до гестации) получали ОР с добавлением пентагидрата сульфата марганца ( $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) в дозе 1433 мг/кг (патент № 2794816, приложение Б). Животные контрольных групп находились на ОР. После окончания экспозиции часть животных была отобрана для изучения эффектов воздействия Mn при пероральном поступлении на взрослый организм самок крыс ( $F_{0\text{♀}}$ ). К остальным самкам-крыс подсаживали интактных самцов с целью получения потомства (1:2). Добавление соли  $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  в рацион животных опытной группы продолжалось в период гестации (3 недели). С целью определения точного количества, поступившего с пищей Mn животным, проводился анализ контрольного и опытного рационов на содержание данного химического элемента (приложение А, таблица А.3).

*Этап II.* На данном этапе экспериментального исследования было получено первое поколение ( $F_1$ ), из которого в возрасте 12 недель были отобраны самцы от



каждой из групп ( $n=20$  для каждой группы) для изучения эффектов пренатального воздействия Mn.

*Этап III.* Оставшихся самок крысят использовали для получения второго поколения ( $F_2$ ), из которого также были отобраны самцы ( $n=20$  для каждой группы) для изучения возможных отдаленных эффектов воздействия Mn.

На протяжении всего эксперимента оценивалось функциональное состояние лабораторных животных по интегральным показателям, включающим изменение внешних признаков и степени их активности, изучение динамики массы тела. У всех экспериментальных групп оценивалось поведение и их когнитивные способности с помощью специализированных поведенческих тестов.

По завершении тестирований проводился забор крови для анализа гематологических и биохимических показателей, определения уровня марганец содержащих ферментов (АРГ1, СОД2) и нейроспецифических показателей (АХЭ, белок S100B), анализа элементного состава биосубстратов (сыворотка крови, кора головного мозга); анализа химических форм элементов («speciation analysis») – Mn в сыворотке крови.

По окончании эксперимента производился забор внутренних органов с целью вычисления массового коэффициента органов, а также проведения анализа элементного состава коры головного мозга.

По завершении эксперимента, полученные в исследованиях данные, были обработаны с использованием программ «Microsoft Excel 2010» и «StatSoft STATISTIA 10».

Таким образом, в ходе проведения эксперимента были сформированы следующие группы: контроль (самки), опыт (самки) – пероральное воздействие марганца; контроль I (потомство), опыт I (потомство) – первое поколение (пренатальное воздействие Mn); контроль II (потомство), опыт II (потомство) – второе поколение (отдаленное воздействие Mn).

Общая схема проведения эксперимента представлена на рисунке 2.

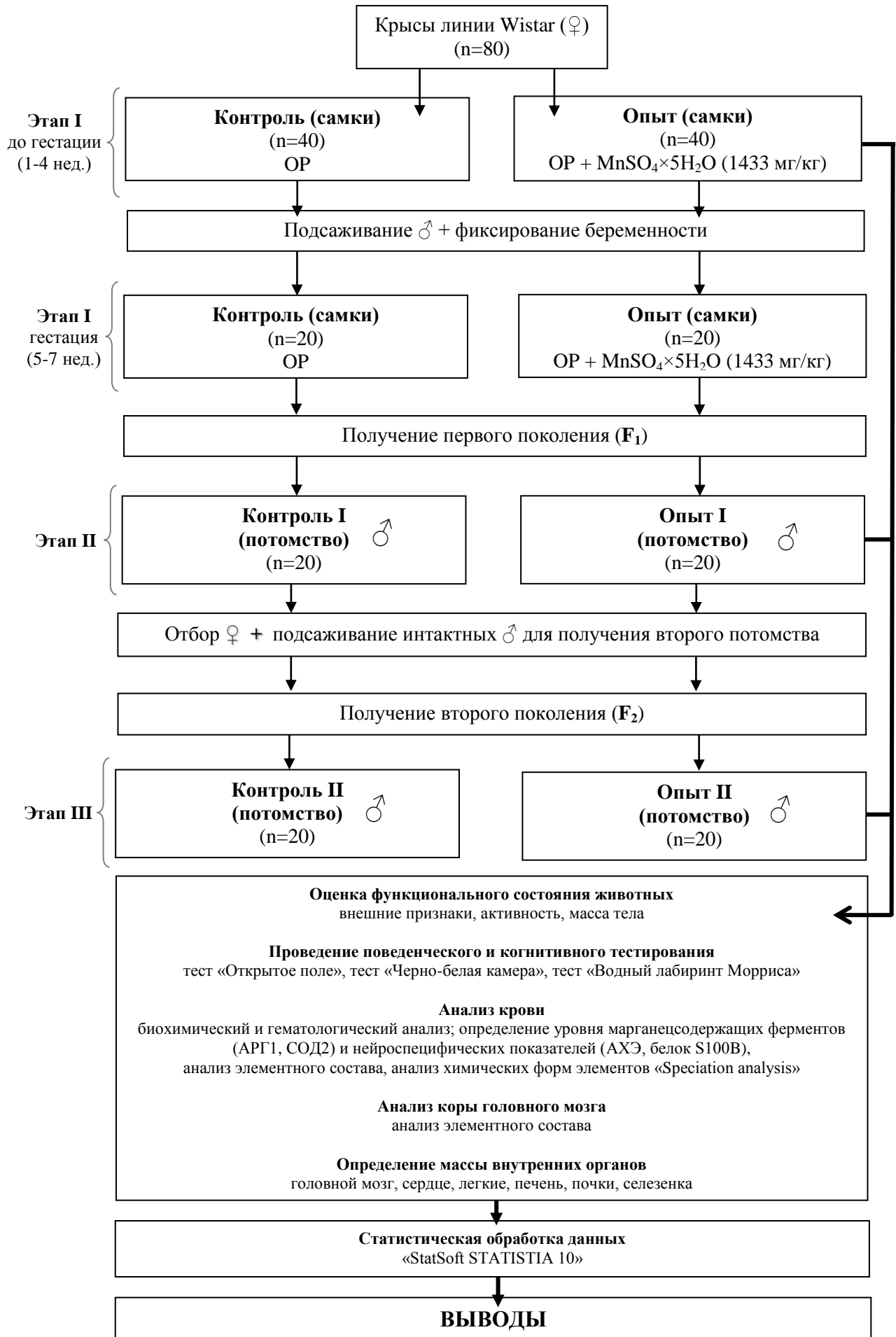


Рисунок 2 – Общая схема исследования

Для наглядности на рисунке 3 представлена упрощенная схема исследования.

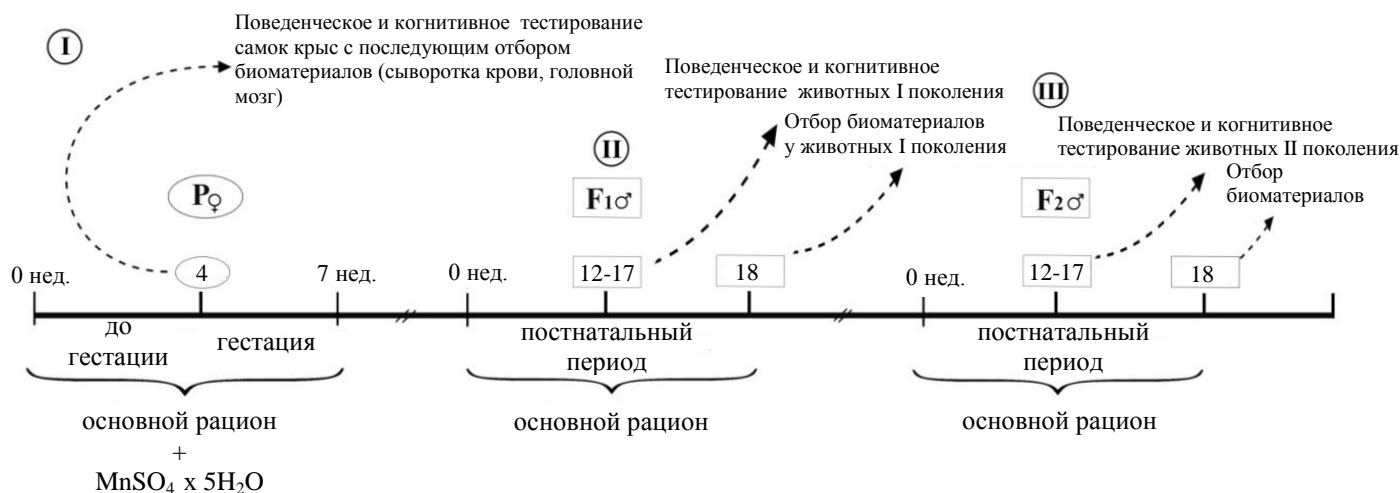


Рисунок 3 – Упрощенная схема исследования

*Обоснование выбора объекта исследования, способа воздействия и дозы введения марганца.* Экспериментальные исследования на животных остаются важным инструментом для изучения биологических эффектов Mn (Dorman D.C. et al., 2012). Анализ литературы показал, что в экспериментальных работах с целью моделирования нейротоксического эффекта Mn чаще всего в качестве объекта исследования используют грызунов (мыши и крысы), а также нематод (*C. elegans*) и рыбок *Danio rerio* (*Zebrafish*) (Cen C. et al., 2022; Martins A.C. et al., 2022; Ferreira S.A. et al., 2022). В данном исследовании были выбраны крысы, что позволило провести более широкий спектр анализов и лучше понять функциональные нарушения, происходящие в организме.

Немаловажным является правильный выбор способа воздействия на организм и дозы введения Mn. Ряд исследований показал, что лабораторных животных, как правило, подвергают пероральному (поступление с питьевой водой или пищей, введение через желудочный зонд), либо ингаляционному воздействию Mn, а также вводят его путем инъекций (подкожных, внутрибрюшинных или интратекальных) (El-Hady W.M. and Galal A.A.A., 2018; Fan X.M. et al., 2020). Большинство исследований основаны на использовании специально разработанных рационов для грызунов, в которые добавляются определенные

дозы соединений металла. В исследованиях с питьевой водой часто используются растворы в сочетании с хлоридом марганца ( $MnCl_2$ ), либо другими растворимыми в воде солями марганца. Исследования с использованием желудочного зонда или микропипетки основаны, как правило, на пероральной «инъекции» болюсной (ударной) дозы Mn (Mercadante C.J. et al., 2016). На наш взгляд, прием пищи является наиболее естественным путем поступления Mn в организм, более точно имитирующий воздействие Mn на человека, что обосновывает выбор введения – *per os*.

Согласно данным «Национального исследовательского совета (США) по питанию лабораторных животных», потребность в Mn у грызунов установлена на уровне  $\geq 10$  мг/кг рациона, однако, следует отметить, что это ниже, чем ранее рекомендуемая доза в 50 мг/кг в 1978 году (National Research Council, 1995). При рассмотрении исследований, посвященных изучению потребностей крыс в Mn, было выявлено немало дискуссионных вопросов. Например, в работах одних ученых было установлено, что оптимальное потребление Mn для роста крыс составляет от 2 до 5 мг/кг рациона, тогда как концентрация 40 мг/кг способствует снижению прироста веса животных (Holtkamp D.E. and Hill R.M., 1950). Напротив, в работах других исследователей сообщалось о более высоких темпах роста у животных, рацион которых содержал 50 мгMn/кг (Anderson B.M. and Parker H.E., 1955).

Согласно данным Европейского агентства по химикатам, в работе по определению диапазона оптимальных концентраций моногидрата сульфата марганца ( $MnSO_4 \times H_2O$ ) было установлено, что Mn не влиял на выживаемость взрослых крыс при концентрации 1667 мг/кг  $MnSO_4 \times H_2O$  ( $p=0,168$ ). Однако при дозе 2444 мг/кг данной соли сообщалось о снижении набора веса животными, репродуктивной дисфункции и повышении смертности (Rehnberg G.L. et al., 1982).

В связи с этим, в экспериментальных исследованиях исключительно важным является формирование рациона, отмечающего адекватному поступлению всех нутриентов. Например, диета AIN-76, разработанная

Американским институтом питания, содержит Mn в дозе 10 мг/кг корма, в то время как полусинтетический казеиновый рациона (ПКР), разработанный в Институте питания АМН, содержит 36 мг/кг (Тышко Н.В. и др., 2011). В проводимом нами исследовании был использован корм, содержащий, по данным производителя, 63,7 мгMn/кг, что в целом удовлетворяет потребностям животных. Следует отметить, что неочищенные корма могут содержать Mn в количестве до 70-120 мг/кг корма (Taylor C.A. et al., 2020).

Согласно проведенному анализу литературы, было выявлено, что ежедневное введение Mn с помощью микропипеток или методов зондирования, а также с питьевой водой в диапазоне от ~25 до 125 мгMn/кг тела способствовало развитию поведенческих, моторных и когнитивных нарушений (Beaudin S.A. et al., 2017; Conley T.E. et al., 2020). Однако подобные результаты во многом зависели от дозы, длительности воздействия и возраста животных. В исследованиях ученых из калифорнийского университета было показано нарушение моторных функций, развитие выраженного сенсомоторного дефицита, нарушение пространственной ориентации и памяти у крыс, подвергавшихся воздействию Mn в течение 6 месяцев в дозе 50 мг/кг/сут (Beaudin S.A. et al., 2017). В работе американских ученых было показано, что внутрижелудочное введение Mn в дозе 100 мг/кг массы тела в течение 8 недель способствовало снижению двигательной активности, повышению концентрации Mn в полосатом теле у половозрелых мышей, в то время, как молодые животные (в возрасте 20 дней) были чувствительны и к более низким дозам – 30 мг/кг, что характеризовалось гиперактивным поведением (Moreno J.A. et al., 2009). Следует отметить, что метод внутрижелудочного введения препаратов, несмотря на быструю и не инвазивную технику, может привести к серьезному стрессу и развитию осложнений.

С целью исключить дополнительный стресс на лабораторных животных в проведенном исследовании Mn добавлялся в общий рацион. Помимо этого, прием пищи является наиболее естественным путем поступления Mn в организм, более точно имитирующим поступление данного металла в организм человека, что еще раз обосновывало выбор способа введения. Ориентируясь на рекомендации по

моделированию нейротоксического воздействия Mn, вносимая доза пентагидрата сульфата марганца ( $MnSO_4 \times 5H_2O$ ) в диету составляла 1433 мг/кг корма (Taylor С.А. et al., 2020). Таким образом, суммарно, с учетом изначального содержания Mn в корме и его молярной концентрации в пентагидратной форме, экспериментальная диета животных содержала Mn в дозе 389,7 мг/кг. Исходя из этого, в пересчете на живую массу, ежедневно в среднем каждое животное получало Mn в дозе 64,4 мг/кг их веса. Следует отметить, что выбранная доза введения соответствовала субтоксической величине, способной приводить к развитию поведенческих и когнитивных нарушений у грызунов, что согласовалось с рядом исследований (Beaudin S.A. et al., 2017; Conley T.E. et al., 2020; Taylor С.А. et al., 2020). Помимо этого, используемая дозировка была в 12 раз меньше ЛД<sub>50</sub>, которая по данным немецкой информационной системы GESTIS Substance Database для неорганического сульфата марганца составляет 2150 мг/кг массы тела, что в пересчете на чистый металл (Mn) равняется 780 мг/кг.

В качестве соли, добавляемой дополнительно к рациону животных с целью достижения заданной дозировки, был использован марганец сернокислый (II), 5-водный ( $MnSO_4 \times 5H_2O$ ). Данная соль произведена компанией АО «Вектон» (г. Санкт-Петербург) с сертифицированной чистотой не менее 98 %, представляющая собой кристаллический порошок от белого до бледно-розового цвета (ТУ 6-09-01-218-84).

## 2.2 Методы исследования

Основные методы, используемые на всех этапах исследования, представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Методы исследования

Задачи	Объект	Методы
Оценка морфофункционального состояния животных	F <sub>0</sub> ♀ F <sub>1</sub> ♂ F <sub>2</sub> ♂	- Регистрация изменения внешних признаков и степени активности животных (Шельгин К.В. и др., 2002)

## Продолжение таблицы 2

Задачи	Объект	Методы
		- Регистрация динамики массы тела и отдельных органов животных, расчет массового коэффициента органов (МК) - Регистрация появления шерстяного покрова и др.
Изучение репродуктивной способности животных, течения и исходов беременности	F <sub>0♀</sub>	- Фиксирование беременности методом вагинальных мазков (Владимирская Т.Э. и др., 2011) - Расчет индексов плодовитости и беременности - Регистрация сроков беременности, количества крысят в помете, размера и массы тела животных при рождении
Оценка поведения и когнитивных способностей	F <sub>0♀</sub> F <sub>1♂</sub> F <sub>2♂</sub>	- Тест «Открытое поле» - Тест «Черно-белая камера» - Тест «Водный лабиринт Морриса»
Определение морфологических и биохимических показателей крови	F <sub>0♀</sub> F <sub>1♂</sub> F <sub>2♂</sub>	- Автоматический геманализатор URIT 2900 Vet Plus (Китай), оценка реакции адаптации животных по методу Гаркави Л.Х. (1990) - Биохимический анализатор CS-T240 (Китай)
Оценка уровня марганецсодержащих ферментов и нейроспецифических показателей	F <sub>0♀</sub> F <sub>1♂</sub> F <sub>2♂</sub>	- Иммуноферментный анализ с использованием приборов Униплан и Проплан (ЗАО «Пикон», Россия)
Оценка валового содержания химических элементов; определение химических форм Mn («speciation analysis»)	F <sub>0♀</sub> F <sub>1♂</sub> F <sub>2♂</sub>	- Масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой с помощью масс-спектрометра NexION 300D (Perkin Elmer NexION 300D ICP Mass Spectrometer, США) в сочетании с высокоэффективной жидкостной хроматографии PerkinElmer (Series 200)
Математическая обработка данных Статистический пакет «STATISTICA 10» (США): U-критерий Манна-Уитни, метод ранговых корреляций Спирмена (Зайцев В.М. и др., 2006)		

### Методы изучения морфофункционального состояния животных

Изучение функционального состояния лабораторных животных включало:

1) оценку изменения внешних признаков и степени активности лабораторных животных 1 раз в 3 суток с помощью специальных шкал, разработанных Шелыгиным К.В. и соавторами (приложение В, таблица В.1);

2) регистрацию изменения массы тела животных путем еженедельного взвешивания с помощью электронных лабораторных весов ВЛТЭ-1100 (ООО НПП «ГОСМЕТР», Россия);

3) оценку физического развития потомства крысят путем ежедневного осмотра и регистрации по дням: появление шерстяного покрова, прорезывание резцов и открытие глаз.

### **Методика фиксирования беременности у лабораторных животных**

Фиксирование беременности осуществлялось методом вагинальных мазков (Владимирская Т.Э. и др., 2011). У всех животных в утренние часы получали влагалищные мазки. Для этого использовали глазные пипетки, которые осторожно вводили во влагалище крыс на глубину 5-6 мм. Затем влагалищные выделения наносились тонким слоем на промаркированное обезжиренное предметное стекло. Препарат сразу же микроскопировали неокрашенным при помощи микроскопа Leica DME (Германия) при увеличении 100х. Первый день беременности устанавливался на основании обнаружения у самок сперматозоидов в мазке (Котельников А.В. и Котельникова С.В., 2005).

Внешние признаки беременности определялись с конца второй недели. В соответствии с данными признаками, у животных увеличивается окружность живота, наблюдается усиленный рельеф сосков (Королев В.А. и др., 2009).

### **Методы оценки состояния репродуктивной системы лабораторных животных**

С целью оценки способности к оплодотворению и зачатию были рассчитаны индексы плодовитости (ИП) и беременности (ИБ). ИП представляет собой отношение числа самок, у которых определяются в вагинальных мазках сперматозоиды, к общему числу самок, подсаженных к самцам, выраженное в процентах. ИБ представляет собой отношение доносивших беременность животных к числу самок, у которых определялись в вагинальных мазках сперматозоиды (Рыбалкин С.П. и др., 2013).



С целью оценки влияния Мп при пероральном поступлении на исход беременности проводилась оценка массы тела самок крыс за время беременности, срок беременности, количество плодов в помете, вес новорожденных, размер плода, гибель новорожденных (Бережнова Т.А. и др., 2016).

### **Методы оценки поведенческих и когнитивных реакций лабораторных животных**

Поведенческие тестирования были выполнены с использованием комплекта тестов, включающих «Открытое поле», «Черно-белая камера» и Тест Морриса» (ООО «НПК Открытая наука», Россия). Данные тесты входят в перечень установок для выполнения психофармакологических тестов согласно приказу Минздрава России, N 281 от 30.04.2013.

*Тест «Открытое поле»* является методом, который широко используется при изучении поведенческих реакций в фармакологии, психогенетике, зоопсихологии, позволяет оценивать нейротропные факторы окружающей среды. С помощью данного теста можно оценить тревожность, исследовательское поведение и общую активность у мышей и крыс.

Открытое поле представляет собой круглую арену, диаметр которой для крыс составляет 100 см, высота стен – 30 см. Пол содержит 13 отверстий и разделен на четверти с центральным кругом диаметром 33 см в середине арены. Для проведения тестирования требуется нормальное лабораторное освещение (Нотова С.В. и др., 2018).

Перед началом тестирования животные были помещены в экспериментальную комнату за 30 минут до начала. Во время опыта установка находилась в специальной звукоизолированной комнате. Все животные поодиночке помещались в центр испытательной площадки, поведенческая активность записывалась в течение 3-х минут с помощью видеосистемы Logitech C920 PRO HD (Китай) для последующего анализа. В конце каждого испытания арена тщательно очищалась 70 %-ым раствором спирта.

При анализе тестирования регистрировали горизонтальную двигательную активность (ГДА) – число пересечений квадратов 4 лапами, вертикальную двигательную активность (ВДА) – вертикальные стойки с опорой и без, число обследований отверстий (ИА) – заглядывание в отверстия, грумминг (ГР) – короткий и длительный, вегетативную деятельность (ДФ) – дефекация, пройденное расстояние (см) и скорость передвижения (см/с). Обработка данных проводилась с помощью программного обеспечения ToxTrac (Швеция).

*Тест «Чёрно-белая камера»* используется в нейробиологических и психофармакологических исследованиях и является одним из наиболее широко используемых тестов для измерения тревожного поведения животных. Установка представляет собой бокс, разделённый на две части: тёмная (закрытая) часть, занимающая 1/3 пространства, и светлая часть. Продолжительность теста для каждого животного составляет 180 сек. Животное помещают на середину светлого отсека, хвостом к отверстию в тёмный отсек. Осуществляют видеорегистрацию поведения с помощью видеосистемы Logitech C920 PRO HD (Китай). После проведения теста анализируют время пребывания животного в отсеках (с), число заходов в отсеки, число выглядываний. Как правило, грызуны обычно предпочитают находиться в темном отсеке. Интервал времени, проведенного в тёмном отсеке, коррелирует с уровнем тревожности, тогда как число выходов и время обследования освещённого отсека – показатели склонности к риску и исследовательской активности. Таким образом, при низком уровне тревоги увеличивается число переходов между темным и светлым отсеками камеры (Амикишиева А.В., 2009).

*Тест «Водный лабиринт Морриса»* является хорошо зарекомендовавшей себя методикой для оценки способности грызунов к пространственному обучению и запоминанию. Это подтверждается тем, что в англоязычной текстовой базе данных медицинских и биологических публикаций, созданной Национальным центром биотехнологической информации, PubMed насчитывается более 10 тысяч работ с использованием данного теста.

Установка представляет собой круглый пластиковый бассейн, диаметр дна которого составляет 1,5 м, высота бортика – 0,6 м. Платформа для крыс изготовлена из оргстекла. Температура воды составляет 24-28°C, данный уровень постоянно поддерживается системой для термостатирования воды (Vucsafusco J.J., 2009).

Бассейн разделен на четыре квадранта, которые произвольно спроектированы на северо-восток, северо-запад, юго-восток и юго-запад. Платформа располагается в центре одного из квадрантов. Существует большое разнообразие протоколов проведения данного тестирования, которые отличаются друг от друга числом повторности тестирования в день и продолжительностью перерыва между ними, местом нахождения платформы, окраской воды, освещением (Kupferschmid B.J. et al., 2017; Frame A.K. et al., 2019). Как правило, стандартный период обучения в этом тесте составляет около пяти дней. Однако этот период не является фиксированным значением и выбирается на усмотрение исследователя.

В нашем исследовании был выбран пятидневный прокол тестирования, который включал 2 этапа: обучение / тренировка (с 1 по 4 день) и пробное испытание (5 день) (рисунок 4).

Животные были помещены в экспериментальную комнату за 30 минут до начала тестирования. Сначала животные подвергались акклиматизации во время одного пробного сеанса «привыкания», где все животные свободно плавали в бассейне без платформы в течение 60 секунд. Далее все группы животных подвергались сессии (длительностью 4 дня) из четырех тренировочных обучающих испытаний в день. Последовательность стартовых позиций выбиралась случайным образом и менялась каждый день. Испытуемого животного вносили в бассейн в одной из четырех исходных позиций. Испытание прекращалось, когда животное находило платформу. В случае, если крыса не находила платформу в течение 60 секунд, экспериментатор помещал ее сам на платформу на 15 секунд. После четырех дней обучения, проводилась проверка пространственной памяти с отсутствием платформы в 1 испытание. Животных

помещали в бассейн и в течение 60 секунд регистрировали перемещения с помощью видеонаблюдения Logitech C920 PRO HD (Китай).

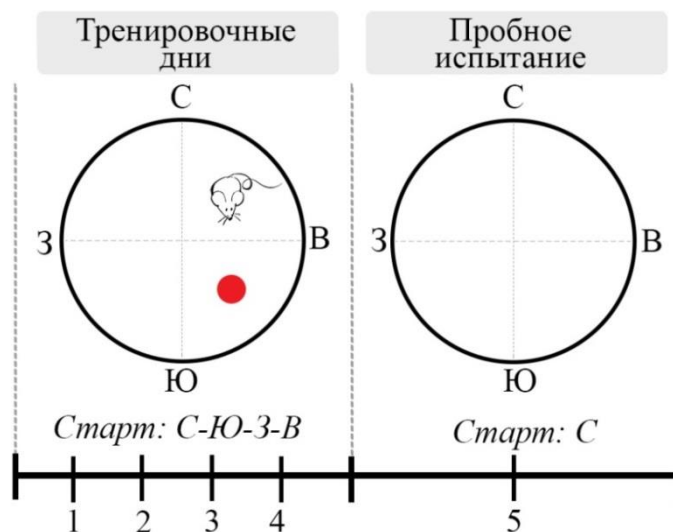


Рисунок 4 – Схема протокола проведения «Теста Морриса» с указанием положения платформы и последовательностью стартовых точек;

Примечание – Красный кружок указывает на видимое положение платформы; пунктирные линии представляют собой границы квадранта.

Обработка полученных видеофайлов осуществлялась при помощи программного обеспечения для отслеживания поведения животных ToxTrac (Швеция).

В качестве основных параметров, оцениваемых в водном лабиринте, были выбраны: расстояние, которое животное преодолевали в бассейне с целью нахождения платформы (см) и латентность спасения (сек). Латентность спасения представляет собой время, затраченное животными на нахождение платформы. Латентность спасения служит мерой обучения и памяти.

### **Методика определения гематологических и биохимических показателей крови**

В конце эксперимента животные выводились из эксперимента путем дислокации шейных позвонков. Забор крови осуществляли из сердечной артерии в вакуумные пробирки VACUETTE с ЭДТА-К2 (этилендиаминтетраацетат) объемом 2 мл для гематологических исследований цельной крови и пробирки



с помощью наборов Rat ARG1 (Arginase I) ELISA Kit, Rat AChE (Acetylcholinesterase) ELISA Kit, Rat SOD2 (Superoxide Dismutase 2, Mitochondrial) ELISA Kit, Rat S100B (S100 Calcium Binding Protein B) ELISA Kit, соответственно. Этапы иммуноферментного анализа были выполнены в соответствии с инструкцией. Все образцы были проанализированы в двух повторах.

Используемые наборы реагентов основаны на сэндвич-методе ИФА. Микропланшеты в наборах сорбированы антителами специфичными к АРГ1, АХЭ, СОД2 и белку S100B. Стандарты или образцы добавляются в определенные лунки планшета и реагируют со специфичными антителами. Далее, авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена добавляется в каждую лунку планшета и проводится инкубация. Не связавшиеся компоненты удаляются промыванием. В каждую лунку добавляется субстрат. Только в лунках, содержащих искомое вещество, антитела с биотином и авидин с пероксидазой хрена появляется голубое окрашивание. Ферментативная реакция прекращается путем добавления раствора серной кислоты. Оптическая плотность измеряется фотометрическим методом на длине волны 450 нм. Концентрация веществ в образцах рассчитывается в соответствии с калибровочной кривой.

### **Методика определения валового содержания и химических форм элементов в различных биосубстратах**

Для забора крови были использованы пробирки VACUETTE с активатором свертывания крови и гелем для отделения эритроцитарной массы (Greiner Bio-One International AG, Австрия). Получение сыворотки осуществлялось вышеописанным способом с последующей заморозкой и транспортировкой.

Забор биообразцов коры головного мозга проводился незамедлительно. Для этого проводили срез ткани с поверхности полушария толщиной около 1-1,5 мм, что примерно соответствовало толщине коры. Образцы промывали ледяной дистиллированной деионизированной водой и подвергали последующей заморозке и транспортировке.

Элементный состав сыворотки крови и коры головного мозга исследовали более, чем по 20 показателям (Ca, P, K, Na, Mg, Fe, Zn, Cu, Mn, Co, Cr, Se, I, Ni, As, V, Pb, Cd, Sn, Hg, Sr). Определение содержания элементов проводилось методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС) с помощью масс-спектрометра NexION 300D (Perkin Elmer NexION 300D ICP Mass Spectrometer, США).

Изотопы элементов, пределы обнаружения приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Значения пределов обнаружения химических элементов

Элемент	Предел обнаружения (ppb)
Ca	0,117
P	3,35
K	0,291
Na	4,26
Mg	0,239
Fe	0,079
Zn	0,0003
Cu	0,003
Mn	0,010
Co	0,001
Cr	0,023
Se	0,0002
I	0,008
As	0,001
V	0,0004
Pb	0,001
Cd	0,002
Sn	0,324

Анализ химических форм элементов («speciation analysis») был использован для определения химических форм Mn в сыворотке крови животных. Анализ форм элементов сыворотки крови лабораторных животных был выполнен посредством разделения сыворотки крови на фракции с последующим определением содержания металлов в каждой фракции методом ИСП-МС (on-line режим). Для определения форм связывания Mn в сыворотке крови в качестве элемент-специфического детектора был использован ИСП-МС NexION 300D (Perkin Elmer NexION 300D ICP Mass Spectrometer, США). Условия эксплуатации

прибора были такими же, как и при определении общего содержания металлов в сыворотке крови.

Разделение проводили с помощью системы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) компании PerkinElmer (Series 200). Для разделения форм металлов использовали метод эксклюзионной (гель-фильтрационной) хроматографии.

Для оптимизации процесса разделения соединений сыворотки крови ВЭЖХ-система была последовательно оснащена хроматографическими колонками двух типов, что позволило улучшить степень разделения ВМС и НМС. Для разделения высокомолекулярных соединений была использована хроматографическая колонка Agilent Bio SEC-5 (7.8 × 300 mm) с размером пор 300 Å. Вторая колонка с размером пор 130 Å (Agilent Bio SEC-5 (7.8 × 150 mm)) применялась для разделения низкомолекулярных компонентов. Для ввода образца в систему использовали автосемплер Series 200 (PerkinElmer), объем вводимой сыворотки составил 25 мкл.

Для проведения математической обработки полученных данных и выявления скрытых пиков при неполном разделении компонентов была использована программа PeakFit v4.11 (Systat Software Inc., США).

### **Математическая обработка результатов исследования**

Обработку полученных данных проводили при помощи методов вариационной статистики с использованием статистического пакета «StatSoft STATISTICA 10». Хранение результатов исследования и первичную обработку материала осуществляли в оригинальной базе данных «Microsoft Excel 2010».

Предварительно для проведения статистического анализа и обработки экспериментальных материалов проводилась проверка нормальности распределения данных. Проверка отклонения распределения вероятностей от нормального распределения производилась по результатам определения совокупности трех критериев, установленных общепринятым методом проверки нормальности – критерий Шапиро-Уилка (Можельский А.Н. и др., 2019), а так же



с учетом рекомендаций критерия Колмогорова и хи-квадрата Пирсона (Лемешко Б.Ю. и Лемешко С.Б., 2005).

Гипотеза о принадлежности данных нормальному распределению была отклонена во всех случаях с вероятностью 95 %, что обосновало применение непараметрических процедур обработки статистических совокупностей (U-критерий Манна-Уитни). Полученные данные представлены в виде медианы (Me) и 25-75-го центилей ( $Q_{25}$ - $Q_{75}$ ). Во всех процедурах статистического анализа рассчитывали достигнутый уровень значимости ( $p$ ), при этом критический уровень значимости в данном исследовании принимался меньшим или равным 0,05.

Взаимосвязи между параметрами оценивали при помощи метода ранговых корреляций Спирмена. Для определения тесноты связи между изучаемыми признаками проводили вычисление коэффициента корреляции ( $r$ ). Коэффициенты корреляции оценивались следующим образом: менее 0,3 – слабая связь, от 0,3 до 0,5 – умеренная, от 0,5 до 0,7 – значительная, от 0,7 до 0,9 – сильная и более 0,9 – очень сильная (Зайцев В.М., 2006).

### ГЛАВА 3. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ, ПОВЕДЕНИЕ И КОГНИТИВНЫЕ СПОСОБНОСТИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ НА ФОНЕ СТРЕССОРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ МАРГАНЦА

Наравне с профессиональным воздействием Mn увеличивается риск хронического влияния относительно низких концентраций данного металла на все население в целом. Необходимо подчеркнуть, что особо опасно воздействие Mn в раннем онтогенезе – в период пренатального и раннего постнатального развития. Как известно, пренатальный период играет ключевую роль в развитии организма. На данном этапе плод наиболее уязвим и чувствителен к воздействию любых неблагоприятных факторов, включая избыточное поступление в материнский организм Mn. Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о том, что неблагоприятные условия окружающей среды и стресс в период внутриутробного развития могут привести к целому комплексу функциональных и структурных нарушений в системах организма (Gonzalez-Casanova I. et al., 2018). Однако эффекты действия Mn в период внутриутробного развития на адаптивные реакции, поведение и когнитивные функции потомства еще далеки от их понимания. Возникает предположение, что последствия воздействия Mn на этапах критического развития органов и функциональных систем плода могут проявляться и в более поздние периоды постнатального развития организма. В частности, подобное воздействие тяжелого металла в период беременности может стать возможным фактором риска возникновения заболеваний центральной нервной системы и привести к отсроченным субклиническим неврологическим нарушениям у потомства в период зрелого возраста. Понимание механизмов подобного программирования и характера взаимодействий специфических и неспецифических процессов, определяющих возникающие нарушения при воздействии Mn в критические периоды эмбриогенеза, является одной из актуальных задач в современной биологии и медицине.

В связи с вышеизложенным проводилось изучение последствий перорального и пренатального воздействия Мп на морфофункциональное состояние, поведенческие и когнитивные реакции животных.

### 3.1 Динамика массы тела и состояние репродуктивной системы лабораторных животных

Все лабораторные животные на протяжении всего эксперимента не показали явного сигнала патологии или аномального поведения (отказ от пищи или воды).

При оценке функциональных показателей отмечалось, что внешний вид животных опытной группы (самки) не отличался от контроля. Согласно шкале изменений внешних признаков крыс, окрас шерсти был ярким, покров без загрязнений и выпадения шерсти. Степень активности животных опытной группы, оцениваемая по шкале изменений активности крыс, соответствовала норме – грызуны были подвижны, имели хороший аппетит.

Согласно полученным данным, у животных опытной группы (самки) на протяжении всего эксперимента отмечался более низкий вес тела при сравнении с контролем (рисунок 5). Достоверные отличия были выявлены на 3 и 5 неделе эксперимента – масса тела животных опытной группы была ниже контроля на 6 % ( $p=0,02$ ).

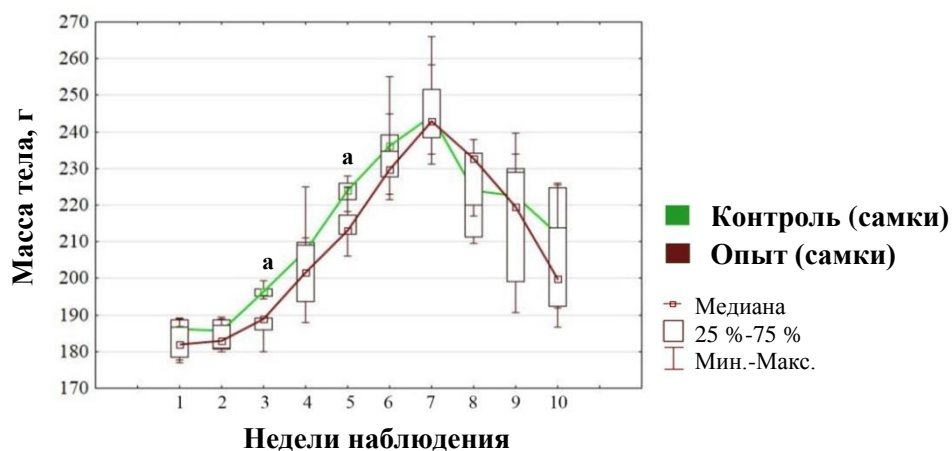


Рисунок 5 – Динамика массы тела самок крыс в прегестационный (1-4 нед.) и гестационный (5-7 нед.) периоды, г

Примечание – а – ( $p \leq 0,05$ ) – р-уровень при сравнении опытной и контрольной групп самок.

Для оценки состояния внутренних органов использовался интегральный показатель – массовый коэффициент органов (МК). Установлено, что пероральное воздействие Mn не влияло на МК мозга, селезенки, почек и сердца. Однако МК печени был статистически достоверно больше у животных опытной группы (самки) на 21 % при сравнении с контролем ( $p=0,02$ ) (рисунок 6).

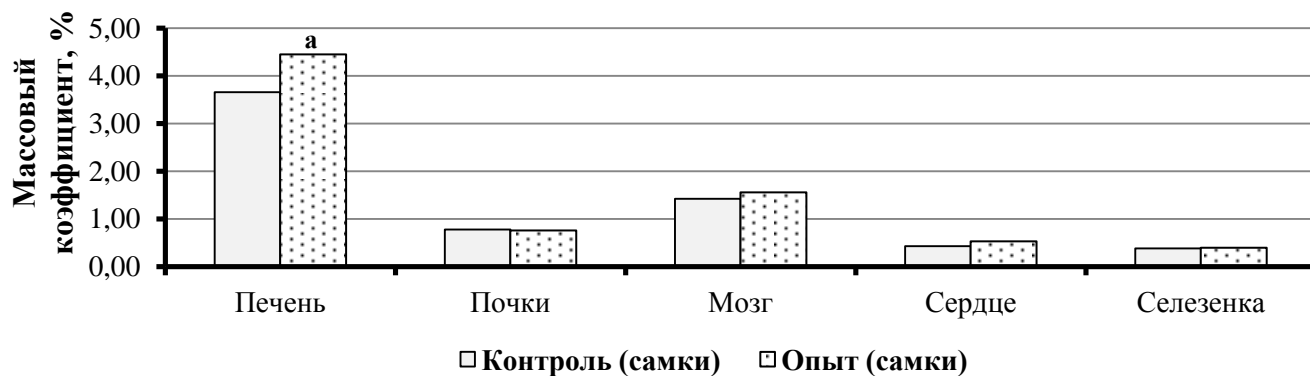


Рисунок 6 – Массовые коэффициенты внутренних органов самок крыс, %

Примечание – Данные представлены в виде медианы; а – ( $p \leq 0,05$ ) –  $p$ -уровень при сравнении опытной и контрольной групп самок.

При изучении репродуктивной способности самок крыс, подвергавшихся пероральному воздействию Mn, не отмечалось достоверных отличий в возможности животных к оплодотворению и зачатию относительно контроля. Однако следует отметить, что индекс плодовитости и беременности был ниже у крыс опытной группы на 20 % и 11,5 %, соответственно (таблица 4).

Таблица 4 – Репродуктивная способность самок крыс при пероральном воздействии марганца

Показатели	Группы	
	Контроль (самки)	Опыт (самки)
Общее количество самок (n)	20	20
Количество обсемененных самок (n)	18	14
Количество беременных самок (n)	16	11
Индекс плодовитости, %	90	70
Индекс беременности, %	88,8	78,5

Беременность крыс каждой группы протекала нормально, у потомства не было обнаружено каких-либо признаков физических аномалий при рождении. У животных, как контрольной, так и опытной группы сроки беременности были в

диапазоне установленных норм. Однако у животных, подвергавшихся в пре- и гестационный периоды воздействию Mn, сроки родов регистрировались статистически достоверно раньше на 1,6 дня ( $p=0,04$ ) относительно контроля (таблица 5).

Таблица 5 – Результаты (Me ( $Q_{25}$ - $Q_{75}$ )) оценки воздействия марганца на течение и исходы беременности крыс

Показатели	Группы		Норма
	Контроль (самки)	Опыт (самки)	
Срок беременности, дни	23,3 (22,9-23,9)	21,7 (20,8-22,2) <sup>a</sup>	21-23
Количество крысят в помете, шт.	7,3 (6,7-8,5)	9,4 (8,2-10,3)	5-9
Масса тела при рождении, г	5,5 (4,6-6,3)	4,3 (3,6-4,9) <sup>a</sup>	5-6
Размер тела крысят при рождении, см	3,9 (3,7-4,2)	3,1 (2,8-3,5) <sup>a</sup>	-
Мертворождение, %	0	0	0-2

Обращает на себя внимание тот факт, что количество крысят в помете животных опытной группы было больше, чем в контрольной. Однако масса тела новорожденных при рождении и их размер был достоверно меньше контрольных значений на 20 % при сравнении медиан.

Таким образом, было установлено, что хроническое пероральное воздействие Mn до и в период беременности способствует снижению привеса, увеличению массового коэффициента печени и ухудшению генеративной функции животных.

### 3.2 Оценка показателей физического развития лабораторных животных

Наблюдения за физическим развитием крысят проводилось в период грудного вскармливания. Было установлено, что у потомства, подвергшегося пренатальному воздействию Mn, открытие глаз происходило на 2,5 суток позже ( $p=0,03$ ), наблюдалась тенденция к более позднему появлению шерстяного покрова и прорезыванию резцов относительно контрольной группы. У животных второго поколения показатели физического развития находились в пределах нормы и практически не отличались от контроля (таблица 6).

Таблица 6 – Показатели (Me (Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub>)) физического развития крысят в период грудного вскармливания

Показатели	Группы				Норма
	Контроль I (потомство)	Опыт I (потомство)	Контроль II (потомство)	Опыт II (потомство)	
Появление шерстяного покрова	8,4 (7,9-9,0)	9,0 (8,9-10,0)	7,8 (7,5-8,3)	8,0 (7,0-9,0)	8-9
Прорезывание резцов	11,3 (10,4-12,2)	12,1 (11,9-13,3)	10,0 (9,7-11,0)	11,2 (10,4-11,9)	9-12
Открытие глаз	15,5 (14,0-16,9)	18,0 (17,2-18,6) <sup>b</sup>	16,0 (15,0-17,0)	14,7 (14,0-16,1)	14-17
Примечание – b – (p≤0,05)– p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп потомства I.					

Масса тела и размер новорожденных животных были ниже, чем в контроле на 20 % (p=0,02). На 2, 4, 5, 7 и 8-ю недели постнатального развития вес крыс статистически значимо продолжал оставаться ниже контрольных значений на 19 %, 24 %, 37 %, 29 %, 35 % и 39 %, соответственно (рисунок 7).

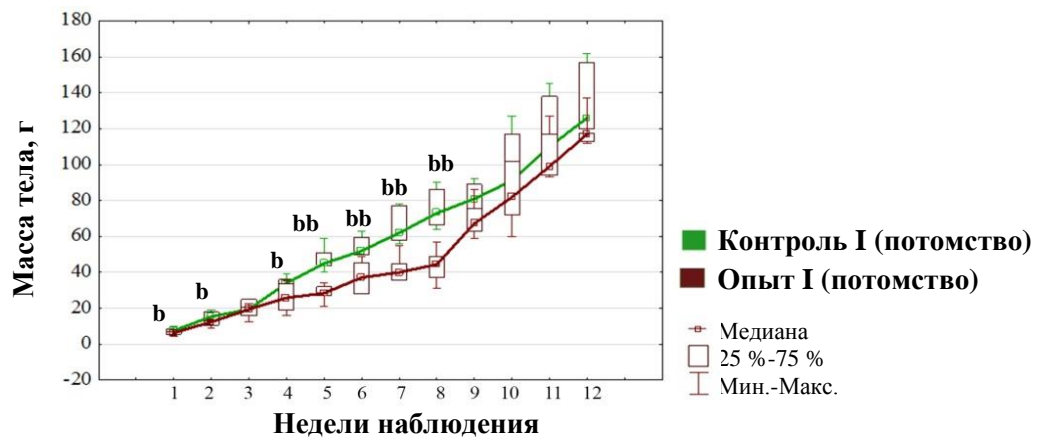


Рисунок 7 – Динамика массы тела животных первого поколения, г

Примечание – b – (p≤0,05); bb – (p≤0,01) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп потомства I.

Анализ массы тела животных второго поколения показал, что масса новорожденных крысят была достоверно ниже в опытной группе на 8 % (p=0,0005) относительно контроля. На 2 неделе и 3 неделе постнатального развития вес животных оставался также ниже контрольных значений – на 29 % (p=0,007) и 9,5 % (p=0,02), соответственно. В ходе дальнейшего развития масса животных опытной группы II сравнивалась с показателями контроля. Статистически достоверных отличий отмечено не было (рисунок 8).

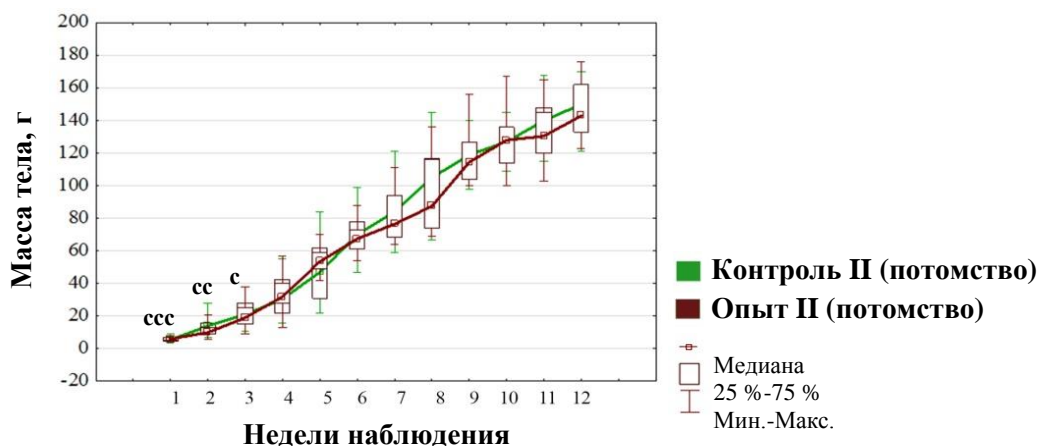


Рисунок 8 – Динамика массы тела животных второго поколения, г

Примечание – с – ( $p \leq 0,05$ ); cc – ( $p \leq 0,01$ ); ccc – ( $p \leq 0,001$ ) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп потомства II.

При анализе МК было установлено, что массовый коэффициент печени животных опытной группы первого поколения был статистически больше, чем в контроле на 7 % ( $p = 0,05$ ) (рисунок 9).

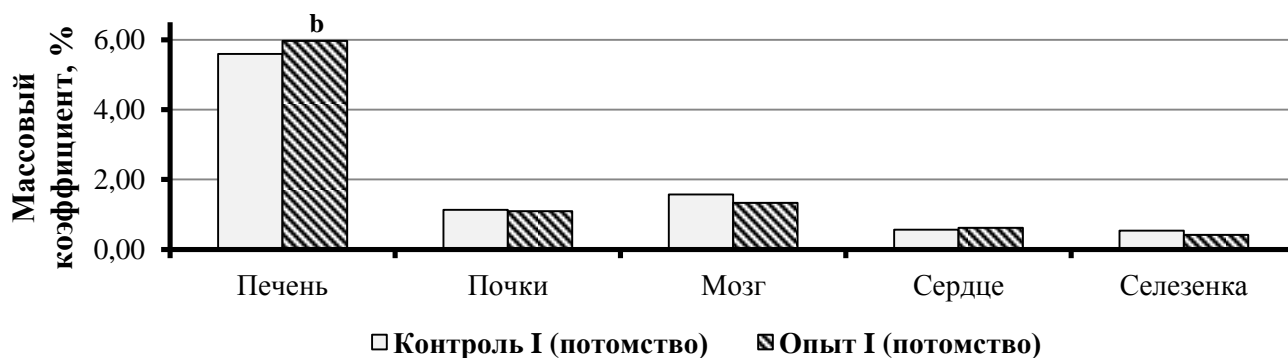


Рисунок 9 – Массовые коэффициенты внутренних органов животных первого поколения, %

Примечание – Данные представлены в виде медианы; b – ( $p \leq 0,05$ ) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп потомства I.

В опытных группах I и II прослеживалась тенденция к более низким значениям массового коэффициента мозга (рисунок 10). При сравнении значений массовых коэффициентов опытных групп I и II статистических значимых изменений не выявлено.

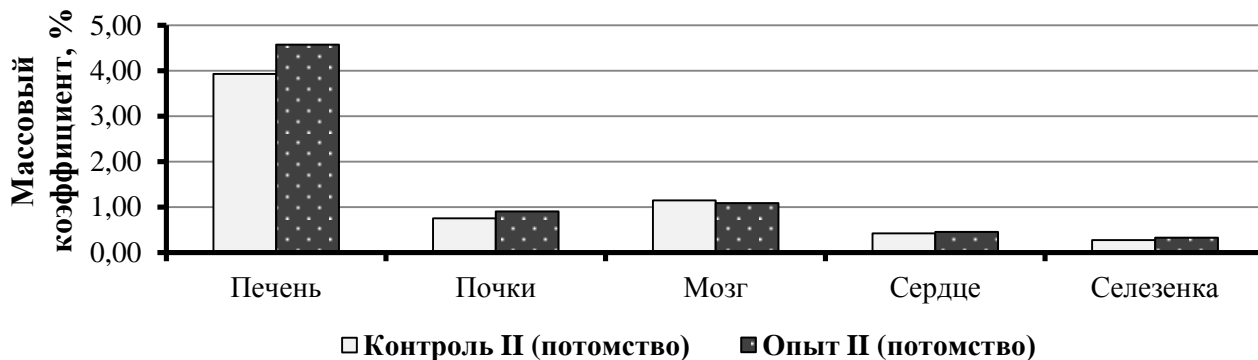


Рисунок 10 – Массовые коэффициенты внутренних органов животных второго поколения, %

Примечание – Данные представлены в виде медианы.

Анализ полученных данных дает основание утверждать, что пренатальное воздействие Mn в большей степени оказывает негативное влияние на физическое развитие крысят, начиная с раннего периода развития и заканчивая более поздним онтогенезом. В незначительной степени отмечаются отдаленные последствия воздействия данного металла на морфофункциональные параметры животных второго поколения, выражающиеся более низкой массой тела на ранних этапах развития.

### 3.3 Особенности поведенческих реакций лабораторных животных

**Тест «Открытое поле».** В исследовании была проведена оценка поведенческой активности животных с помощью теста «Открытое поле».

В таблице 6 представлены результаты данного тестирования самок крыс, подвергшихся пероральному воздействию Mn. У животных опытной группы самок крыс была установлена более низкая локомоторная активность. Это подтверждалось тем, что количество пройденного расстояния животными опытной группы было меньше, чем в контроле – показатель на уровне 75 центиля у животных опытной группы (самки) ( $Q_{75}$  опыта) меньше показателя на уровне 25 центиля у животных контрольной группы (самки) ( $Q_{25}$  контроля) на 20 % ( $p=0,01$ ), также скорость передвижения животных опытной группы в тестовой площадке



была ниже –  $Q_{75}$  опыта (самки) меньше  $Q_{25}$  контроля (самки) на 23 % ( $p=0,03$ ) (таблица 7).

Таблица 7 – Показатели ( $Me (Q_{25}-Q_{75})$ ) поведения самок крыс в тесте «Открытое поле»

Показатели	Контроль (самки)	Опыт (самки)
Общее расстояние (см)	1 284,0 (1 262,2-1 362,2)	943,77 (919,84-1 022,04) <sup>aa</sup>
Скорость (см/с)	5,87 (5,6-6,05)	3,66 (3,1-4,3) <sup>a</sup>
Суммарный груминг	3,5 (3,0-4,0)	5,5 (4,0-7,0)
Дефекация	1,5 (0,0-2,0)	3,5 (2,0-4,0)
Обследование отверстий	2,0 (1,0-3,0)	4,5 (4,0-5,0) <sup>aa</sup>
Примечание – a – ( $p \leq 0,05$ ); aa – ( $p \leq 0,01$ ) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп самок.		

Тест «Открытое поле» используют не только для анализа двигательной активности, но также и для измерения тревожности. На рисунке 11 представлена репрезентативная карта активности животных контрольной и опытной групп самок.

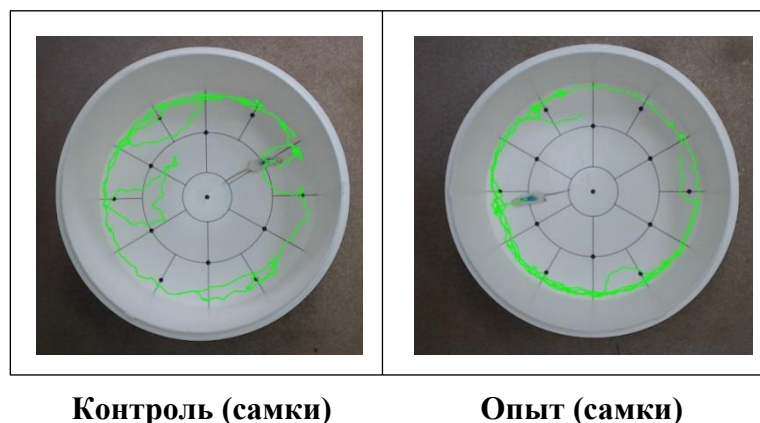


Рисунок 11 – Траектории локомоторного движения самок крыс

Каждая траектория движения представляет собой общее расстояние, пройденное испытуемым животным за 3-х минутный период теста. Как видно из представленного рисунка, животные контрольной группы, помещенные в камеру открытого поля, сначала находились в области периферии возле стен установки, избегая центра открытого поля. Однако в последующем животные адаптировались к условиям и в конечном итоге пытались исследовать область полупериферии. Данное поведение, согласно данным Carter M. и Shieh J.C. (2015),

соответствует норме.

Напротив, животные опытной группы (самки) передвигались в основном в области периферии поля и значительно реже находились на открытом пространстве, что соответствует модели беспокойного поведения животных.

Уровень эмоционального напряжения животных оценивался также по показателям суммарного груминга и дефекации. У животных опытной группы (самки) отмечалась тенденция к увеличению частоты груминга, значение медианы которого было больше контроля на 57 %; увеличилось количество фекальных болюсов на 133 %. Полученные данные могут свидетельствовать о возможной повышенной тревожности и эмоциональности исследуемых животных.

У животных опытной группы (самки) была зафиксирована более высокая ориентировочно-исследовательскую активность, которая сопровождалась частым обнюхиванием нор –  $Q_{75}$  опыта (самки) было больше  $Q_{25}$  контроля на 33,3 % ( $p=0,007$ ).

При оценке поведенческих реакций животных, полученных в первом поколении, было отмечено следующее (таблица 8).

Таблица 8 – Показатели (Me ( $Q_{25}$ - $Q_{75}$ )) поведения животных первого поколения в тесте «Открытое поле»

Показатели	Контроль I (потомство)	Опыт I (потомство)
Общее расстояние (см)	1 127,5 (1 061,9-1 205,4)	2 647,7 (2 245,5-3 126,6) <sup>b</sup>
Скорость (см/с)	4,42 (4,26-5,43)	7,34 (6,67-7,53) <sup>bb</sup>
Суммарный груминг	2,0 (0,5-4,0)	4,0 (3,0-5,0)
Дефекация	2,0 (1,0-3,0)	4,0 (3,0-5,0) <sup>bbb</sup>
Обследование отверстий	4,0 (1,0-5,0)	8,0 (6,0-9,5) <sup>bb</sup>
Примечание – b – ( $p \leq 0,05$ ); bb – ( $p \leq 0,01$ ); bbb – ( $p \leq 0,001$ ) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп потомства I.		

У животных опытной группы I (потомство), напротив, была зафиксирована высокая двигательная активность: расстояние, пройденное животными в арене было статистически значимо больше при сравнении с контролем –  $Q_{25}$  опыта больше  $Q_{75}$  контроля на 86 % ( $p=0,03$ ), скорость передвижения животных в арене была выше –  $Q_{25}$  опыта больше  $Q_{75}$  контроля на 23 % ( $p=0,01$ ).

При рассмотрении паттернов передвижения животных опытной группы,

подвергшейся пренатальному влиянию Мп, было установлено увеличение активности животных в центральной зоне поля. Животные опытной группы продемонстрировали более высокую тенденцию к исследованию площади всей арены (рисунок 12).

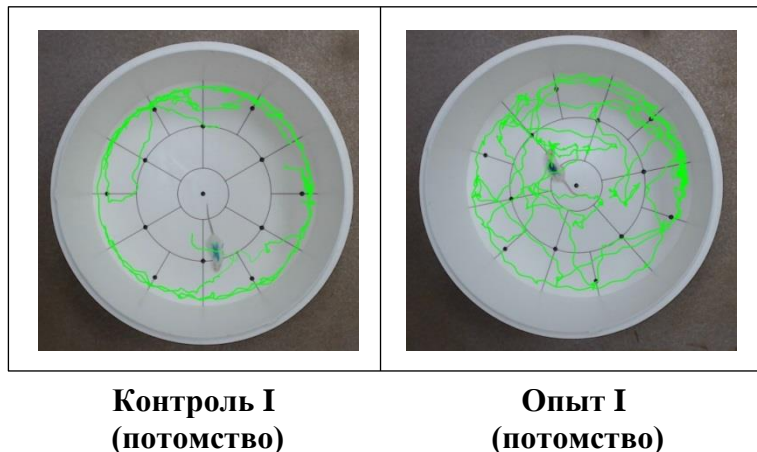


Рисунок 12 – Траектории локомоторного движения животных первого поколения

Несмотря на то, что у животных увеличивалась частота посещения центральных зон арены, что, как правило, свидетельствует о снижении тревожности, частота груминга и количество фекальных болюсов имело тенденцию к увеличению – значение медиан по обоим показателям было выше контрольных значений на 100 %. Возможно, подобная реакция объясняется гиперактивным поведением животных опытной группы.

Количество исследуемых нор у животных опытной группы I (потомство) было больше, чем в контроле –  $Q_{25}$  опыта больше  $Q_{75}$  контроля на 20 % ( $p=0,003$ ), что свидетельствует о высокой ориентировочно-исследовательской активности животных.

Оценивая основные параметры тестирования у животных второго поколения, были получены следующие результаты (таблица 9).

У животных опытной группы II (потомство) наблюдалась тенденция к увеличению общего пройденного расстояния и скорости. Статистически достоверные отличия были характерны только для показателей дефекация и обследование отверстий. Количество фекальных болюсов у животных опытной группы было больше относительно контроля –  $Q_{75}$  опыта больше  $Q_{75}$  контроля на

67 % ( $p=0,002$ ). Частота обследования отверстий также была выше в опытной группе –  $Q_{25}$  больше  $Q_{75}$  на 50 % ( $p=0,002$ ).

Таблица 9 – Показатели ( $Me (Q_{25}-Q_{75})$ ) поведения животных второго поколения в тесте «Открытое поле»

Показатели	Контроль II (потомство)	Опыт II (потомство)
Общее расстояние (см)	1 262,2 (1 239,8-1 301,3)	2 072,1 (1 301,3-2 266,6)
Скорость (см/с)	6,58 (5,74-6,77)	6,86 (6,77-7,14)
Суммарный груминг	3,0 (2,0-4,0)	3,0 (2,0-5,0)
Дефекация	2,0 (1,0-3,0)	4,0 (3,0-5,0) <sup>cc</sup>
Обследование отверстий	2,0 (0,5-4,0)	7,0 (6,0-8,0) <sup>cc</sup>
Примечание – cc – ( $p \leq 0,01$ ) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп потомства II.		

Траектория движения животных опытной группы II (потомство) затрагивала область периферии и полупериферии поля, что было характерно и для животных контрольной группы. Однако число входов в область 2/3 периферии было выше в опыте при сравнении с контролем (рисунок 13).

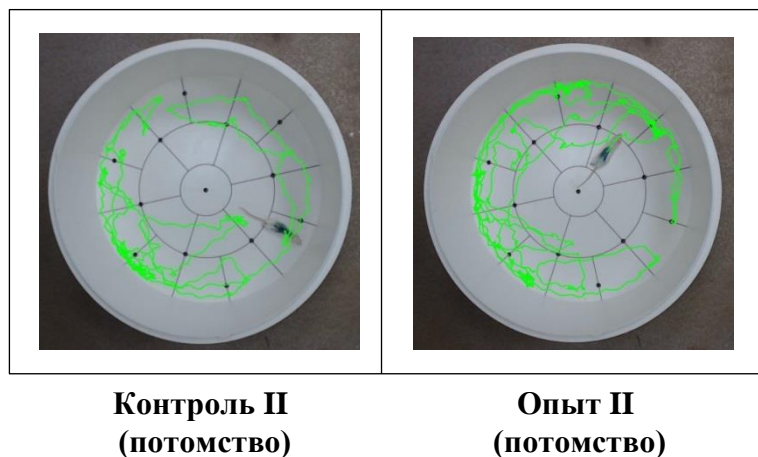


Рисунок 13 – Траектории локомоторного движения животных второго поколения

При сравнении опытной группы I (потомство) с опытной группой II (потомство) достоверных отличий не наблюдалось.

**Тест «Черно-белая камера».** Результаты данного тестирования показали, что в опытной группе (самки) и опытной группе I (потомство) количество выглядываний из темного отсека было статистически значимо меньше относительно контроля на 82 % ( $p=0,01$ ) и 55 % ( $p=0,05$ ), соответственно. Следует отметить, что время, проведенное животными опытных групп самок и первого

поколения в черном отсеке, также было больше при сравнении с контрольной группой (таблица 10).

Таблица 10 – Показатели (Me (Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub>)) поведения животных в тесте «Черно-белая камера»

Группы	Показатели		
	Время в темном отсеке, с	Время в светлом отсеке, с	Выглядывания, шт
Контроль (самки)	163,5 (161,2-168,8)	16,5 (11,3-18,5)	11,0 (8,0-12,0)
Опыт (самки)	177,0 (165,8-180,0) <sup>a</sup>	8,0 (0,0-23,3) <sup>a</sup>	2,0 (0,0-3,0) <sup>aa</sup>
Контроль I (потомство)	163,9 (150,8-172,5)	16,1 (7,5-30,1)	9,0 (7,0-10,0)
Опыт I (потомство)	178,0 (175,0-180,0) <sup>b</sup>	0,0 (0,0-5,0)	4,0 (0,0-7,0) <sup>b</sup>
Контроль II (потомство)	165,0 (148,3-170,0)	15,0 (0,0-31,8)	8,0 (5,0-11,0)
Опыт II (потомство)	167,0 (166,0-173,5)	13,0 (6,5-14,0)	6,0 (4,0-9,0)

Примечание – a – (p≤0,05); aa – (p≤0,01) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп самок; b – (p≤0,05) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп потомства I.

Исходя из полученных данных, результаты теста «Черно-белая камера» свидетельствуют о тревожном поведении животных опытных групп, подвергшихся пероральному и пренатальному воздействию Mn, что согласуется с результатами теста «Открытое поле».

Таким образом, результаты теста «Открытое поле» и «Черно-белая камера» показали, что пролонгированное пероральное воздействие Mn способствует снижению двигательной активности животных на фоне инициации ориентировочно-исследовательской активности и тревожного поведения. Пренатальное воздействие Mn увеличивает локомоторную активность в совокупности с повышением тревожности и ориентировочно-исследовательской активности у животных на более поздних этапах постнатального развития, подобные изменения свидетельствуют о гиперактивном поведении. У животных второго поколения прослеживаются возможные отдаленные эффекты воздействия Mn, которые сопровождаются увеличением эмоциональной напряженности и ориентировочно-исследовательской реакции, однако менее выражено. Полученные данные указывают на то, что нарушение поведения может возникать в результате пренатального воздействия Mn и проявляться на более поздних этапах онтогенеза в нескольких поколениях.

### 3.4 Особенности когнитивных способностей лабораторных животных

**Тест «Водный лабиринт Морриса».** Пространственную ориентацию и память лабораторных животных оценивали в тесте Морриса.

Эффекты перорального воздействия Мп на основные показатели взрослых самок крыс, оцениваемые водным лабиринтом, представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Показатели (Ме (Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub>)) когнитивных функций самок крыс в тесте «Водный лабиринт Морриса»

Дни тестирования	Контроль (самки)	Опыт (самки)
Латентность спасения, сек		
1 день	35,9 (35,7-36,9)	42,9 (42,0-44,5)
2 день	20,2 (19,7-21,5)	40,0 (37,5-45,0) <sup>a</sup>
3 день	12,9 (10,55-15,0)	28,0 (23,2-34,2) <sup>aa</sup>
4 день	10,9 (9,6-12,0)	22,0 (20,8-30,1) <sup>aa</sup>
5 день	8,5 (8,1-8,6)	19,0 (16,7-24,9) <sup>a</sup>
Длина траектории поиска платформы, см		
1 день	619,0 (600,0-621,1)	684,7 (681,8-693,2)
2 день	300,8 (291,3-322,0)	468,4 (457,1-560,0)
3 день	217,0 (209,4-235,4)	440,0 (404,4-490,0)
4 день	113,0 (110,0-123,0)	341,1 (264,2-345,5) <sup>aa</sup>
5 день	97,4 (92,6-103,2)	190,0 (177,7-281,7) <sup>a</sup>
Примечание – а – (p≤0,05); aa – (p≤0,01) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп самок.		

Из полученных данных видно, что в течение первого тренировочного дня самки, как контрольной, так и опытной группы, показали аналогичную задержку выхода на видимую платформу. Однако при дальнейшем анализе было отмечено, что животные контрольной группы (самки) хорошо обучались – они постепенно научились находить платформу, о чем свидетельствует более быстрое обнаружение платформы и уменьшение длины траектории ее поиска.

На фоне этого, животные опытной группы (самки) характеризовались более длительным латентным периодом и большим пройденным расстоянием (рисунок 14А, 14Б).

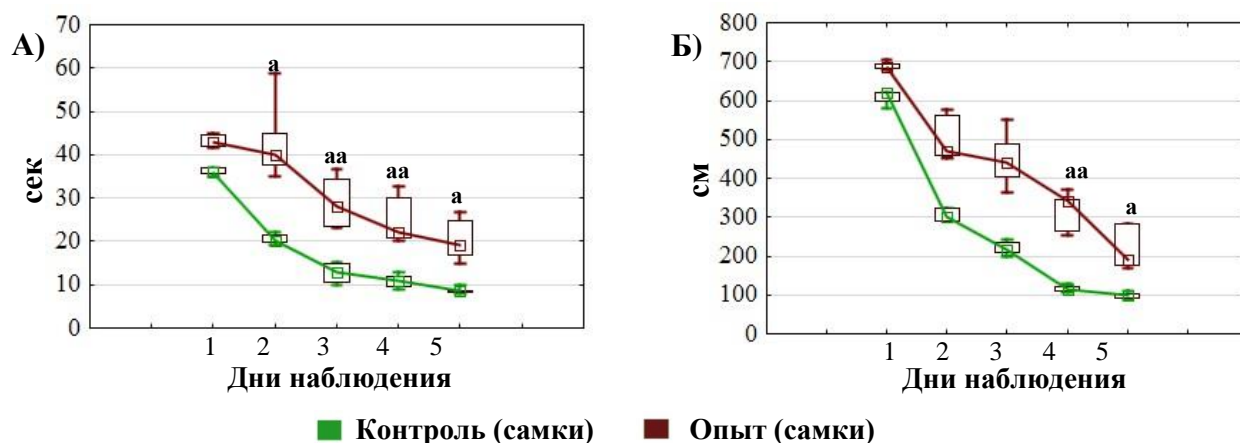


Рисунок 14 – Латентный период нахождения платформы (А) и длина траектории ее поиска (Б) самками-крыс

Примечание – a – ( $p \leq 0,05$ ); aa – ( $p \leq 0,01$ ) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп самок

Было зарегистрировано, что на второй день обучения животным опытной группы потребовалось статистически достоверно больше времени на 98 % ( $p=0,03$ ) на нахождение платформы. Аналогичные отличия были выявлены и на 3, 4 и 5-ый день проведения водного теста.

Следует отметить, что длина траектории поиска платформы у животных опытной группы была больше, чем у контрольных крыс. На третий день обучения животные, подвергавшиеся пероральному введению Mn, преодолевали статистически значимо гораздо большее расстояние, чем интактные (на 102 %,  $p=0,002$ ). Похожие отличия были выявлены на 4 и 5 день тестирования – пройденное расстояние животными опытной группы было больше контрольных значений на 200 % ( $p=0,002$ ) и 95 % ( $p=0,03$ ), соответственно.

Траектория движения животных опытной группы незначительно отличалась от контроля, однако они гораздо реже посещали сектор, где ранее находилась платформа (рисунок 15).

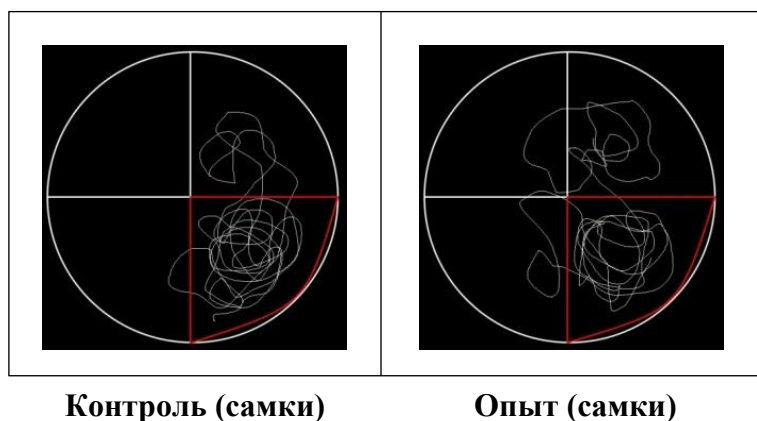


Рисунок 15 – Траектории движения самок крыс

Эффекты пренатального воздействия Мп на основные показатели животных первого поколения, оцениваемые водным лабиринтом, представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Показатели (Me (Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub>)) когнитивных функций животных первого поколения в тесте «Водный лабиринт Морриса»

Дни тестирования	Контроль I (потомство)	Опыт I (потомство)
Латентность спасения, сек		
1 день	33,3 (32,0-35,0)	54,7 (46,2-55,7) <sup>b</sup>
2 день	17,0 (15,3-18,7)	53,3 (45,2-55,3) <sup>bb</sup>
3 день	13,7 (12,0-16,7)	53,0 (39,4-54,0) <sup>bb</sup>
4 день	10,0 (9,0-11,8)	50,4 (47,0-51,9) <sup>b</sup>
5 день	8,0 (7,9-9,0)	45,0 (37,3-46,4) <sup>bb</sup>
Длина траектории поиска платформы, см		
1 день	583,5 (580,0-597,0)	825,4 (799,0-849,0) <sup>bb</sup>
2 день	265,0 (250,0-282,4)	764,0 (692,5-779,3) <sup>b</sup>
3 день	220,0 (200,7-231,5)	760,0 (709,0-785,9) <sup>bb</sup>
4 день	111,0 (100,0-119,6)	728,7 (717,7-739,8) <sup>bb</sup>
5 день	90,8 (84,0-100,5)	681,2 (642,6-690,0) <sup>bb</sup>
Примечание – b – (p≤0,05); bb – (p≤0,01) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп потомства I.		

Из таблицы видно, что животные контрольной группы быстро освоили задачу теста и в течение сессии обучающих испытаний улучшали свои навыки. Напротив, у животных опытной группы, начиная уже с первого дня обучения, наблюдались достоверные отклонения от контрольных значений. Для большей наглядности данные представлены в виде графика (рисунок 16А, 16Б).



Пренатально стрессированным животным требовалось больше времени для адаптации к условиям тестирования.

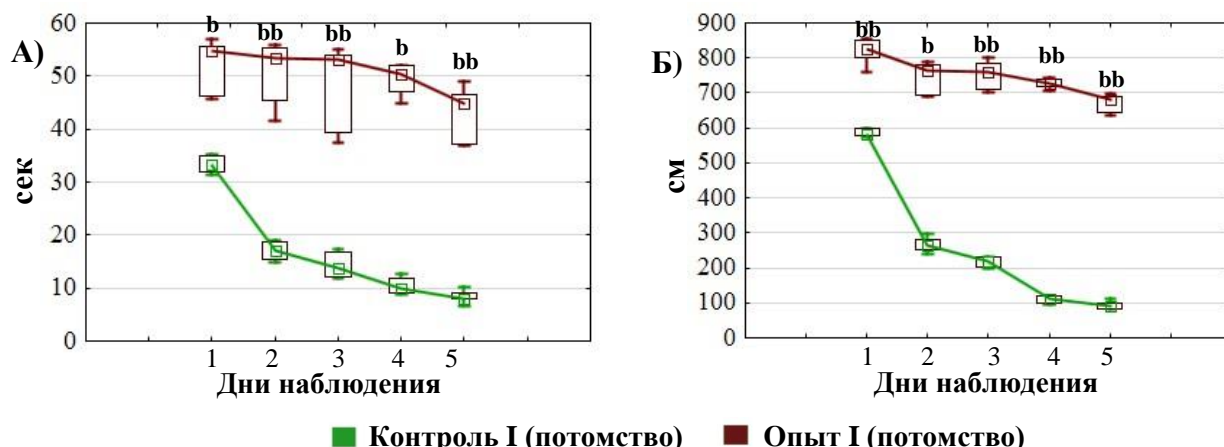


Рисунок 16 – Латентный период нахождения платформы (А) и длина траектории ее поиска (Б) животными первого поколения

Примечание – b – ( $p \leq 0,05$ ); bb – ( $p \leq 0,01$ ) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп потомства I.

Опытным особям требовалось гораздо больше времени, чтобы найти платформу – значение  $Q_{25}$  опыта была достоверно больше  $Q_{75}$  контроля на 32 % ( $p=0,05$ ) в первый день тренировки; на 141 % ( $p=0,002$ ) во второй день; на 136 % ( $p=0,007$ ) в третий день и на 298 % ( $p=0,03$ ) в четвертый день.

Аналогичные изменения были характерны и для пройденного расстояния животными опытной группы I (потомство) – отмечались более длинные дистанции по сравнению с контролем – значение  $Q_{25}$  опыта было достоверно больше  $Q_{75}$  контроля на 34 % ( $p=0,002$ ) в первый день тренировки; на 145 % ( $p=0,02$ ) во второй день тренировки; на 206 % ( $p=0,007$ ) в третий день тренировки и 500 % ( $p=0,003$ ) в четвертый день тренировки.

На пятый день животные были протестированы на воспроизведение полученного навыка. Животные контрольной группы успешно справились с заданием – целенаправленно двигались в сектор, циркулируя в нем, где ранее находилась платформа. На фоне этого, поведение животных опыта I (потомство) было менее целенаправленным, движение носило хаотичный характер. Животные заплывали в сектор, где в период обучения находилась платформа, но в отличие от контрольных особей не задерживались в данной области, быстро проходя ее

(рисунок 17). Полученные данные свидетельствуют о нарушении процессов обучения и запоминания.

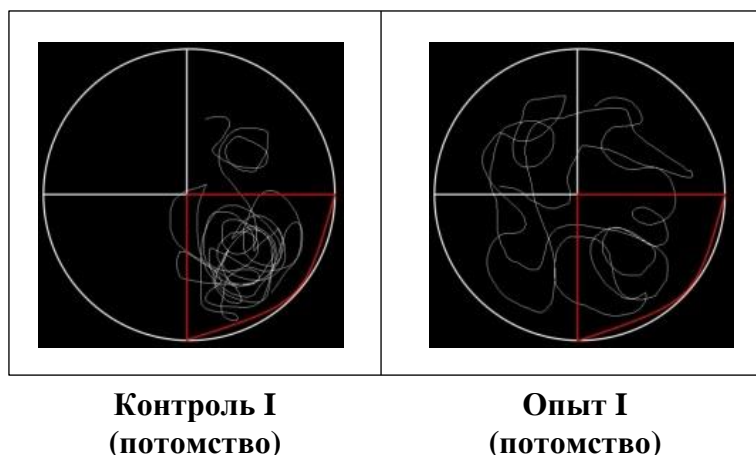


Рисунок 17 – Траектории движения животных первого поколения

Эффекты воздействия Mn на основные показатели животных второго поколения, оцениваемые водным лабиринтом, представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Показатели ( $Me (Q_{25}-Q_{75})$ ) когнитивных функций животных второго поколения в тесте «Водный лабиринт Морриса»

Дни тестирования	Контроль II (потомство)	Опыт II (потомство)
Латентность спасения, сек		
1 день	30,4 (29,0-32,0)	38,6 (36,0-40,0)
2 день	18,0 (15,4-18,6)	24,0 (22,8-27,0)
3 день	12,6 (11,7-14,0)	16,8 (13,5-17,5)
4 день	9,2 (9,1-11,0)	16,0 (15,0-17,0)
5 день	8,3 (7,9-10,0)	26,0 (24,0-28,0) <sup>c</sup>
Длина траектории поиска платформы, см		
1 день	566,0 (485,0-579,0)	610,0 (590,0-630,0)
2 день	253,0 (242,0-260,0)	350,0 (289,0-363,0)
3 день	207,0 (200,0-222,0)	235,0 (225,0-244,0)
4 день	100,0 (90,0-113,0)	136,0 (125,0-148,0)
5 день	87,0 (80,0-95,0)	287,0 (230,0-322,0) <sup>cc</sup>
Примечание – c – ( $p \leq 0,05$ ); cc – ( $p \leq 0,01$ ) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп потомства II.		

При анализе полученных данных, было отмечено, что у животных опытной группы II (потомство) латентный период, а также пройденное расстояние практически не отличались от значений контроля с 1 по 4 обучающий день. Животные опытной группы хорошо ориентировались в пространстве,

подвергались обучению. Однако следует отметить, что опытным особям все же требовалось больше времени для прохождения теста (рисунок 18).

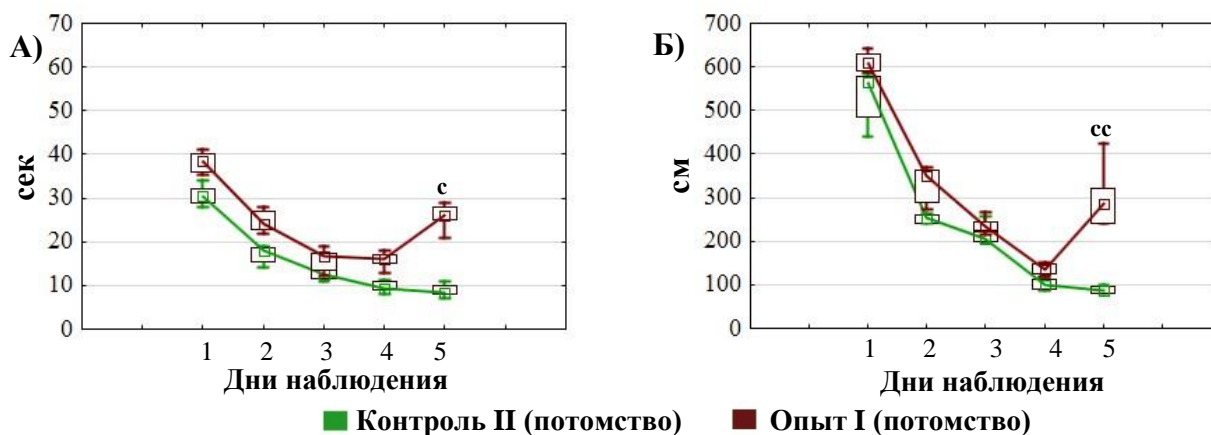


Рисунок 18 – Латентный период нахождения платформы (А) и длина траектории ее поиска (Б) животными второго поколения

Примечание – с – ( $p \leq 0,05$ ); cc – ( $p \leq 0,01$ ) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп потомства II.

Наиболее интересные результаты были получены на пятый день испытания. Данные опытной группы II (потомство) значительно отличились от контроля. Было выявлено, что латентный период крыс опытной группы II (потомство) до целевого квадранта, места, где ранее находилась платформа, статистически достоверно больше – значение  $Q_{25}$  опыта больше  $Q_{75}$  контроля на 140 % ( $p=0,03$ ). Длина траектории поиска платформы у животных данной группы также достоверно увеличилась – значение  $Q_{25}$  опыта было больше  $Q_{75}$  контроля на 142 % ( $p=0,002$ ).

По представленным индивидуальным паттернам траектории движения в водном тесте можно увидеть, что животные опытной группы II (потомство) двигались по периферии, вблизи бортика бассейна, что носит название тигмотаксиса (рисунок 19).

Таким образом, проведенное тестирование показало, что воздействие нетоксичных доз Mn оказывает негативное воздействие на когнитивные способности организма. Впервые задокументированы стойкие поведенческие нейротоксические эффекты пренатального воздействия Mn в двух поколениях. Воздействие Mn может вызывать отсроченные нейробиологические

эффекты, которые проявляются на более поздних этапах онтогенеза животных. У первого поколения наблюдается ослабление когнитивных способностей, что сопровождается нарушением пространственной ориентации и способности к обучению.

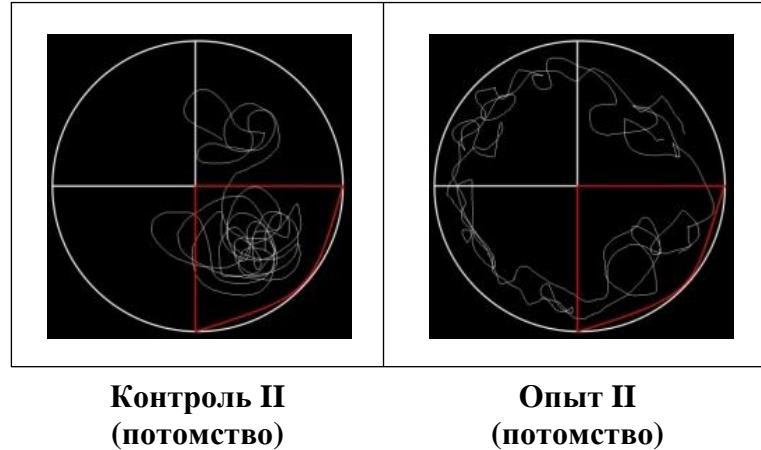


Рисунок 19 – Траектории движения животных второго

Второе поколение, несмотря на сохранение способности к ориентации в пространстве и консолидация (постепенное улучшение изучаемых показателей по сравнению с предыдущим днем) во время обучающих испытаний, после удаления платформы из бассейна значительно реже посещают целевой квадрант, что свидетельствует об ухудшении пространственной памяти.

На основании вышеизложенного можно заключить, что субтоксическое пероральное воздействие Mn в пре- и гестационный периоды приводит к ухудшению репродуктивной способности и влияет на исходы беременности животных. Пренатальное воздействие Mn оказывает влияние на физическое развитие животных, начиная с раннего периода и заканчивая более поздним онтогенезом. В незначительной степени отмечаются отдаленные последствия воздействия данного металла на морфофункциональные параметры животных второго поколения, выражающиеся более низкой массой тела на ранних этапах развития. Согласно результатам поведенческого и когнитивного тестирования, последствия пренатального воздействия Mn могут проявляться в двух поколениях в период зрелого возраста, характеризующиеся изменением двигательной активности, эмоциональных и когнитивных функций.

#### ГЛАВА 4. МОРФОБИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ И ЭЛЕМЕНТНЫЙ СТАТУС ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ НА ФОНЕ СТРЕССОРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ МАРГАНЦА

С эколого-физиологических позиций особое значение приобретает изучение гематологических и биохимических показателей крови, которые отражают взаимодействие организма с окружающей средой (Миняйло Л.А. и др., 2021). Также многочисленными работами была установлена практическая значимость использования данных об особенностях элементного статуса организма с целью понимания причин распространения экозависимых заболеваний (Корчина Т.Я. и др., 2018a; 2018b). Это связано с тем, что формирование элементного состава организма определяется как его текущей физиологической потребностью в химических элементах, так и во многом зависит от биогеохимических факторов и техногенной нагрузки (Миняйло Л.А. и Корчина Т.Я., 2022). Поэтому не возникает сомнений, что все основополагающие физиологические и биохимические процессы в организме человека и животных зависят от гомеостаза макро- и микроэлементов, дисбаланс которого может привести к развитию заболеваний. Помимо этого, исследования последних лет показывают большую значимость оценки не только валового содержания элементов в различных биосубстратах, но и отдельных химических форм металлов (Ajsuvakova O.P. et al., 2020; Ajsuvakova O.P. et al., 2021, Notova S.V. et al., 2022; Michalke B. et al., 2022).

В связи с этим, в данной главе проводилась оценка эффектов перорального и пренатального воздействия Mn в двух поколениях на гематологические и биохимические показатели крови животных, уровень марганецсодержащих и нейроспецифических показателей, минеральный обмен.

#### 4.1 Особенности гематологических показателей крови лабораторных животных

В результате проведения гематологического анализа были получены следующие данные (таблица 14).

Таблица 14 – Морфологические показатели (Me (Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub>)) крови самок крыс

Показатели	Группы		Нормы*
	Контроль (самки)	Опыт (самки)	
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	8,7 (5,23-8,81)	5,13 (3,55-5,96) <sup>a</sup>	3-17
Лимфоциты, %	58,9 (43,9-62,6)	66,9 (58,7-72,8) <sup>aa</sup>	55-83
Моноциты, %	5,45 (3,75-6,6)	6,3 (4,4-12,1)	0-6
Нейтрофилы, %	33,7 (27,9-36,3)	23,6 (17,8-29,3)	13-36
Эозинофилы, %	2,1 (1,5-2,9)	1,9 (1,2-2,77)	0-4
Базофилы, %	0,9 (0,7-1,5)	1,0 (0,6-1,45)	0-1
Эритроциты, 10 <sup>12</sup> /л	6,05 (5,87-6,06)	5,8 (5,5-6,12)	5-10
Гемоглобин, г/л	132,0 (116,0-133,0)	128,0 (125,0-130,0)	120-170
Гематокрит, %	42,2 (40,5-42,6)	41,1 (41,0-44,5)	40-50
Тромбоциты, 10 <sup>9</sup> /л	607,5 (506,7-636,5)	564,0 (446,2-605,7) <sup>a</sup>	200-1500
Примечание – a – (p≤0,05); aa – (p≤0,01) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп самок; * – согласно данным Sharp P.E. (1998).			

При сравнении значений медиан было выявлено, что уровень лейкоцитов у самок крыс, подвергшихся пероральному воздействию Mn, был ниже контрольных значений на 40 % (p=0,02), при этом процентное содержание лимфоцитов статистически достоверно превышало контроль на 8 % (p=0,01), отмечалась тенденция к более высокому содержанию моноцитов на фоне снижения нейтрофилов. Содержание тромбоцитов было достоверно ниже в опытной группе (самки) на 7 % (p=0,04) относительно контроля.

Согласно критерию определения неспецифических адаптационных реакций по лейкоцитарной формуле было выявлено, что изменения в показателях белой крови соответствовали реакции активации (РА), что несет основную антистрессорную функцию (Гаркави Л.Х. и др., 1990). При рассмотрении индивидуальных анализов животных было выявлено, что у 33 % животных

опытной группы (самки) отмечалась реакция повышенной активации (РПА), процентное содержание лимфоцитов стремилось к верхней границе нормы, в то время как содержание нейтрофилов находилось в пределах нижней зоны нормы; 42 % животных опытной группы имели реакцию спокойной активации (РСА) и 25 % – реакцию тренировки (РТ).

Гематологические показатели крови животных первого и второго поколения представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Морфологические показатели (Me (Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub>)) крови животных первого и второго поколения

Показатели	Группы				Нормы*
	Контроль I (потомство)	Опыт I (потомство)	Контроль II (потомство)	Опыт II (потомство)	
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	6,8 (2,9-7,9)	6,8 (5,0-7,5)	7,1 (6,5-8,9)	7,0 (6,2-8,3)	3-17
Лимфоциты, %	55,5 (43,4-64,0)	50,0 (46,1-64,4)	58,9 (53,9-62,6)	56,9 (48,7-62,8)	55-83
Моноциты, %	2,8 (2,3-3,3)	2,4 (2,0-3,8)	3,3 (2,4-4,1)	2,4 (1,7-2,6)	0-6
Нейтрофилы, %	34,9 (33,4-39,8)	35,2 (33,6-38,1)	36,02 (34,8-32,3)	35,7 (33,9-38,3)	13-36
Эозинофилы, %	2,3 (1,6-2,9)	2,5 (2,0-3,1)	2,4 (1,8-2,9)	2,1 (1,7-3,3)	0-4
Базофилы, %	1,0 (0,6-1,4)	0,8 (0,5-1,0)	0,96 (0,7-1,1)	0,5 (0,3-1,2)	0-1
Эритроциты, 10 <sup>12</sup> /л	5,34 (5,1-5,73)	4,87 (4,8-5,58)	8,34 (7,49-8,56)	7,57 (7,33-8,06)	5-10
Гемоглобин, г/л	125,5 (114,0-132,0)	121,0 (106,0-136,0)	138,0 (125,0-140,0)	129,0 (123,5-140,5)	120-170
Гематокрит, %	40,8 (38,6-41,4)	45,6 (40,5-48,4)	46,6 (43,6-48,0)	43,8 (42,9-47,5)	40-50
Тромбоциты, 10 <sup>9</sup> /л	230,0 (209,0-269,0)	215,5 (193,0-240,0)	244,0 (202,5-266,5)	217,5 (201,5-242,0)	200-1500
Примечание – * – согласно данным Sharp P.E. (1998).					

В крови животных опытных групп I и II достоверные различия по сравнению с контрольной группой выявлены не были. Все значения анализируемых показателей находились в пределах рекомендуемых значений. Используя относительное содержание лимфоцитов в качестве сигнального показателя оценки вида адаптационных реакций, было установлено, что животные, как I, так и II опытной группы находились в состоянии реакции тренировки.

## 4.2 Особенности биохимических показателей крови лабораторных животных

При анализе биохимических показателей крови лабораторных животных, подвергшихся пероральному воздействию Mn, были получены следующие результаты (таблица 16).

Таблица 16 – Биохимические показатели (Me (Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub>)) сыворотки крови самок крыс

Показатели	Группы		Нормы*
	Контроль (самки)	Опыт (самки)	
Глюкоза, ммоль/л	10,6 (10,3-11,1)	19,09 (19,04-19,2) <sup>aa</sup>	4,4-16,6
Общий белок, г/л	78,2 (77,2-79,0)	49,2 (48,9-56,5) <sup>aa</sup>	45-84
Альбумин, г/л	38,0 (37,0-39,0)	30,0 (28,1-30,2) <sup>a</sup>	29-59
Бил.общий, мкмоль/л	1,71 (1,55-2,19)	1,46 (1,18-1,47)	0-10,94
Холестерин, ммоль/л	2,83 (2,79-2,86)	3,15 (3,14-3,17) <sup>a</sup>	1,29-2,58
Триглицериды, ммоль/л	0,76 (0,72-0,79)	1,31 (1,2-1,51) <sup>aa</sup>	0,1-2,3
Мочевина, ммоль/л	3,1 (2,8-5,7)	3,03 (3,02-3,4)	2,8-7,2
Креатинин, мкмоль/л	60,8 (58,5-64,2)	57,4 (57,1-57,6)	35,6-123,7
Мочевая кислота, мкмоль/л	154,2 (149,6-163,0)	156,4 (139,6-164,3)	137-488

Примечание – a – (p≤0,05); aa – (p≤0,01) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп самок; \* – согласно данным Sharp P.E. (1998).

Достоверные различия при сравнении опыта с контрольной группой были выявлены по многим показателям. В опытной группе (самки) было зафиксировано статистически значимо более высокий уровень глюкозы, холестерина и триглицеридов – Q<sub>25</sub> опыта было больше Q<sub>75</sub> контроля на 71 %, 10 % и 178 %, соответственно, при p=0,01. Следует отметить, что данные показатели опытной группы превышали и верхнюю границу нормы на 16 %, 23 % и 9 %, соответственно. На фоне этого, уровень общего белка и альбумина был достоверно ниже – значение Q<sub>75</sub> опыта было меньше Q<sub>25</sub> контроля на 27 % и 18 %, соответственно.

Биохимические показатели крови лабораторных животных первого поколения находились в пределах нормы, исключением явились триглицериды и холестерин в сыворотке крови животных опытной группы I (потомство), содержание которых превышало верхнюю границу нормы на 42 % и 17 %, соответственно. При сравнении показателей с контролем было выявлено



статистически значимо более высокий уровень холестерина и триглицеридов – значение  $Q_{25}$  опыта I было больше  $Q_{75}$  контроля I на 72 % ( $p=0,008$ ) и 347 % ( $p=0,008$ ), соответственно. Уровень же глюкозы и общего белка в опытной группе первого поколения был достоверно ниже контрольных значений –  $Q_{75}$  опыта I было меньше  $Q_{25}$  контроля I на 6 % ( $p=0,01$ ) и 4 % ( $p=0,03$ ), соответственно (таблица 17).

Таблица 17 – Биохимические показатели (Me ( $Q_{25}$ - $Q_{75}$ )) сыворотки крови животных первого и второго поколения

Показатели	Группы				Нормы *
	Контроль I (потомство)	Опыт I (потомство)	Контроль II (потомство)	Опыт II (потомство)	
Глюкоза, ммоль/л	10,4 (10,3-11,03)	8,2 (7,5-9,8) <sup>bb</sup>	10,7 (10,5-11,8)	9,8 (8,3-10,5)	4,4-16,6
Общий белок, г/л	79,7 (78,5-79,9)	65,3 (54,1-75,5) <sup>b</sup>	66,6 (55,6-76,7)	65,5 (58,8-70,3)	45-84
Альбумин, г/л	42,0 (40,0-45,0)	34,3 (29,9-36,4)	43,0 (32,0-43,2)	44,7 (34,0-46,0)	29-59
Бил.общий, мкмоль/л	1,82 (1,55-2,69)	1,35 (1,18-1,55)	1,0 (0,93-1,16)	1,57 (1,26-1,79)	0-10,94
Холестерин, ммоль/л	1,66 (1,48-2,2)	2,88 (2,55-3,02) <sup>bb</sup>	1,69 (1,49-2,2)	2,34 (2,16-2,48) <sup>c,d</sup>	1,29-2,58
Триглицериды, ммоль/л	0,61 (0,58-0,67)	1,13 (1,0-1,27) <sup>bb</sup>	0,63 (0,39-0,66)	0,45 (0,38-0,6) <sup>dd</sup>	0,1-2,3
Мочевина, ммоль/л	4,0 (2,9-4,7)	3,6 (3,2-3,9)	3,5 (3,0-3,8)	3,7 (2,7-4,9)	2,8-7,2
Креатинин, мкмоль/л	62,8 (58,2-63,3)	80,0 (67,1-84,8)	81,5 (81,04-82,3)	71,3 (60,1-97,3)	35,6-123,7
Мочевая кислота, мкмоль/л	152,6 (139,4-168,7)	179,8 (150,4-198,6)	198,2 (183,1-202,9)	156,5 (147,5-156,6)	137-488
Примечание – b – ( $p \leq 0,05$ ); bb – ( $p \leq 0,01$ ) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп потомства I; c – ( $p \leq 0,05$ ) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп потомства II; dd – ( $p \leq 0,01$ ) – p-уровень при сравнении опытной группы II (потомство) с опытной группой I (потомство); * – согласно данным Sharp P.E. (1998).					

У животных второго поколения абсолютно все анализируемые биохимические параметры крови находились в пределах нормы. При сравнении с контрольными значениями было обнаружено, что уровень холестерина был достоверно выше в опыте II – значение  $Q_{25}$  опытной группы второго поколения было практически наравне с  $Q_{75}$  контроля II ( $p=0,03$ ).

При сравнении опыта II с опытом I было выявлено, что содержание холестерина и триглицеридов в сыворотке крови животных второго поколения статистически значимо ниже, чем у животных первого поколения – значение  $Q_{75}$

опыта II было меньше с  $Q_{25}$  опыта I на 3 % ( $p=0,02$ ) и 80 % ( $p=0,008$ ), соответственно.

Для наглядности полученные результаты представлены в виде графика (рисунок 20).

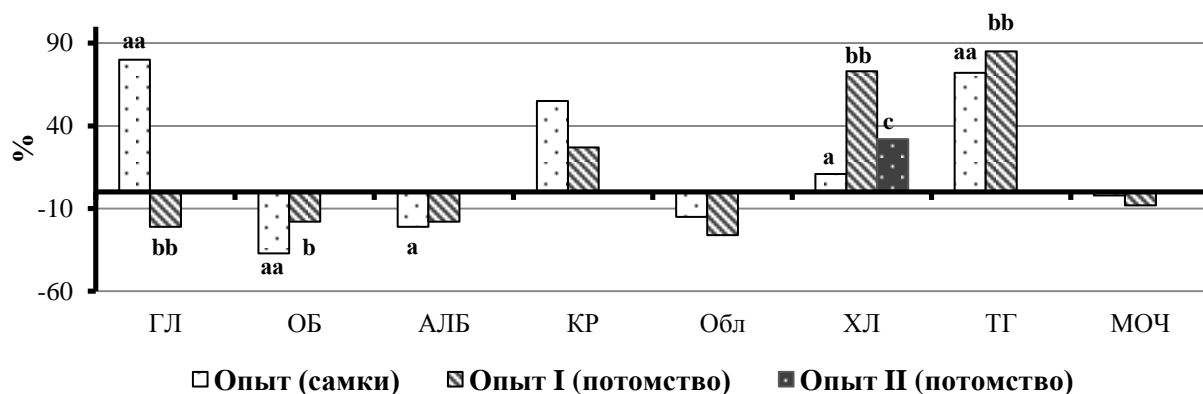


Рисунок 20 – Относительные значения содержания биохимических показателей крови животных опытных групп по сравнению с контролем, %

1 Примечание – ГЛ – глюкоза; ОБ – общий белок; АЛБ – альбумины; КР – креатинин; Обл – общий билирубин; ХЛ – холестерин; ТГ – триглицериды; МОЧ – мочевины.

2 Примечание – Ось X (0) – уровень биохимических показателей в контрольной группе; a – ( $p \leq 0,05$ ); aa – ( $p \leq 0,01$ ) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп самок; b – ( $p \leq 0,05$ ); bb – ( $p \leq 0,01$ ) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп потомства I; c – ( $p \leq 0,05$ ) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп потомства II.

Таким образом, биохимический анализ крови показал, что, независимо от способа поступления в организм, Mn оказывает негативное влияние на углеводный, белковый и липидный метаболизм.

#### 4.3 Оценка уровня марганецсодержащих ферментов в сыворотке крови лабораторных животных

В рамках диссертационной работы было изучено содержание в сыворотке крови животных марганецсодержащих металлоферментов – аргиназы и супероксиддисмутаза.

Анализ содержания аргиназы в сыворотке крови крыс выявил следующие отклонения (таблица 18).

Таблица 18 – Показатели (Ме (Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub>)) содержания аргиназы и супероксиддисмутазы в сыворотке крови лабораторных животных, нг/мл

Группа	Аргиназа	Супероксиддисмутаза
Контроль (самки)	0,414 (0,411-0,415)	0,0671 (0,0668-0,0727)
Опыт (самки)	1,174 (1,018-1,18) <sup>aa</sup>	0,1562 (0,1536-0,1573) <sup>aa</sup>
Контроль I (потомство)	0,394 (0,375-0,411)	0,0678 (0,0659-0,0708)
Опыт I (потомство)	0,506 (0,469-0,513) <sup>b, ee</sup>	0,0652 (0,064-0,0689) <sup>ee</sup>
Контроль II (потомство)	0,4 (0,32-0,417)	0,0638 (0,0619-0,0728)
Опыт II (потомство)	0,415 (0,412-0,418) <sup>d, f</sup>	0,0674 (0,067-0,0687) <sup>ff</sup>
Примечание –aa – (p≤0,01) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп самок; b – (p≤0,05); bb – (p≤0,01) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп потомства I; d – (p≤0,05) – p-уровень при сравнении опытной группы II (потомство) с опытной группой I (потомство); ee – (p≤0,01) – p-уровень при сравнении опытной группы I (потомство) с опытной группой (самки); f – (p≤0,05), ff – (p≤0,01) – p-уровень при сравнении опытной группы II (потомство) с опытной группой (самки).		

В группе, в которой животные подвергались пероральному воздействию Mn, наблюдалось статистически значимо более высокое содержание АРГ1 – значение Q<sub>25</sub> опыта (самки) было больше Q<sub>75</sub> контрольной группы (самки) на 145 % (p=0,01), при сравнении медиан – на 183 % (p=0,01).

У животных, подвергшихся пренатальному воздействию, уровень АРГ1 также было достоверно выше – Q<sub>25</sub> опыта I (потомство) больше Q<sub>75</sub> контроля I (потомство) на 14 % (p=0,01); на 28 % (p=0,05) при сравнении медиан. Однако данный показатель был ниже, чем в группе самок крыс опытной группы – Q<sub>75</sub> меньше Q<sub>25</sub> на 49 % (p=0,01).

У животных второго поколения уровень сывороточной АРГ1 был близок к контрольным значениям. При сравнении со значениями опытной группы (самки) было отмечено, что уровень фермента статистически значимо был ниже – Q<sub>75</sub> опыта II (потомство) меньше Q<sub>25</sub> опыт (самки) на 59 % (p=0,03).

Сравнения содержания АРГ1 между первым и вторым поколением, было установлено, что в опытной группе (потомство) I уровень аргиназы достоверно выше, чем опытной группе (потомство) II – Q<sub>25</sub> больше Q<sub>75</sub> на 12 % (p=0,04).

Таким образом, наибольшие отклонения в содержании АРГ1 были характерны для животных опытной группы (самки) и опытной группы I (потомство).

В таблице 15 представлены результаты содержания марганцевой

супероксиддисмутазы. Статистически значимые отличия от контроля были характерны только для опытной группы (самки). Установлено, что уровень СОД2 в данной группе был достоверно выше, чем в контроле –  $Q_{25}$  опыта (самки) больше  $Q_{75}$  контроля (самки) на 111 % ( $p=0,01$ ) и на 133 % ( $p=0,01$ ) при сравнении значений медиан. В отношении других опытных групп сколько-нибудь значимых различий выявлено не было. Однако было установлено, что уровень СОД2 в опыте I и II (потомство) был достоверно ниже на 55 % ( $p=0,01$ ) относительно опытной группы (самки).

Таким образом, проведенный анализ показал, что на фоне избыточного перорального поступления Mn в сыворотке крови увеличивается содержание АРГ1 и СОД2. При пренатальном воздействии у потомства отмечается повышенное содержание АРГ1.

#### 4.4 Оценка уровня нейроспецифических показателей в сыворотке крови лабораторных животных

В рамках экспериментальной работы проводилась оценка содержания в сыворотке крови животных двух нейроспецифических показателей – ацетилхолинэстеразы и белка S100B.

Анализ содержания АХЭ в сыворотке крови крыс выявил следующие отклонения (таблица 19).

Таблица 19 – Показатели ( $Me (Q_{25}-Q_{75})$ ) содержания ацетилхолинэстеразы и белка S100B в сыворотке крови лабораторных животных

Группа	Ацетилхолинэстераза, нг/мл	S100B, пг/мл
Контроль (самки)	0,524 (0,369-0,792)	93,8 (90,2-100,2)
Опыт (самки)	0,721 (0,656-0,765)	181,8 (168,2-218,7) <sup>aa</sup>
Контроль I (потомство)	0,575 (0,348-0,672)	92,7 (88,5-95,03)
Опыт I (потомство)	0,843 (0,821-0,877) <sup>bb, ee</sup>	101,3 (100,8-114,2) <sup>e</sup>
Контроль II (потомство)	0,568 (0,333-0,647)	87,3 (78,5-105,03)
Опыт II (потомство)	0,65 (0,647-0,694) <sup>dd</sup>	128,9 (125,6-129,7) <sup>dd</sup>

В группе крыс, подвергавшихся пероральному воздействию Mn,

наблюдалась только тенденция к повышению содержания данного фермента.

Напротив, у животных опытной группы I данный показатель статистически значимо превышал контрольные значения –  $Q_{25}$  опыта I (потомство) больше  $Q_{75}$  контроля I (потомство) на 22 % ( $p=0,01$ ) и на 47 % ( $p=0,01$ ) при сравнении значений медиан.

Сравнивая результаты с показателями самок, у опытных животных первого поколения также наблюдалась достоверно более высокое содержание АХЭ –  $Q_{25}$  опыта I (потомство) больше  $Q_{75}$  опыта (самки) на 7,3 % ( $p=0,01$ ). При сравнении результатов анализа животных первого и второго поколения, отмечено, что  $Q_{25}$  первой опытной группы было больше  $Q_{75}$  второй опытной группы на 18,3 % ( $p=0,01$ ).

В опытной группе II прослеживалась только тенденция к повышению содержания ацетилхолинэстеразы при сравнении с контролем II, в тоже время уровень АХЭ в данной группе был ниже, чем в опыте (самки).

У животных опытной группы (самки) был зафиксирован статистически значимо более высокий уровень белка S100B – значение  $Q_{25}$  опыта (самки) больше  $Q_{75}$  контроля (самки) на 68 % ( $p=0,01$ ) и на 84 % при сравнении значений медиан.

У животных, подвергшихся пренатальному воздействию Mn, была отмечена только тенденция к более высокому содержанию данного белка. Следует отметить, что при сравнении полученных результатов со значениями опыта (самки), было установлено, что  $Q_{75}$  опыта I (потомство) меньше  $Q_{25}$  опыта (самки) на 32 % ( $p=0,03$ ).

У животных второго поколения содержание белка S100B было выше относительно контроля – значение  $Q_{25}$  опыта II больше  $Q_{75}$  контроля II на 19,5 % и на 48 % при сравнении медиан. Достоверных изменений относительно значений опыта самок выявлено не было. Сравнения содержания белка в сыворотке крови между вторым и первым поколением, было установлено, что уровень S100B был выше в опытной группе II (потомство), где  $Q_{25}$  опыта II было больше  $Q_{75}$  опыта I на 10 % ( $p=0,01$ ).

Для наглядности данные представлены в виде графика (рисунок 21).

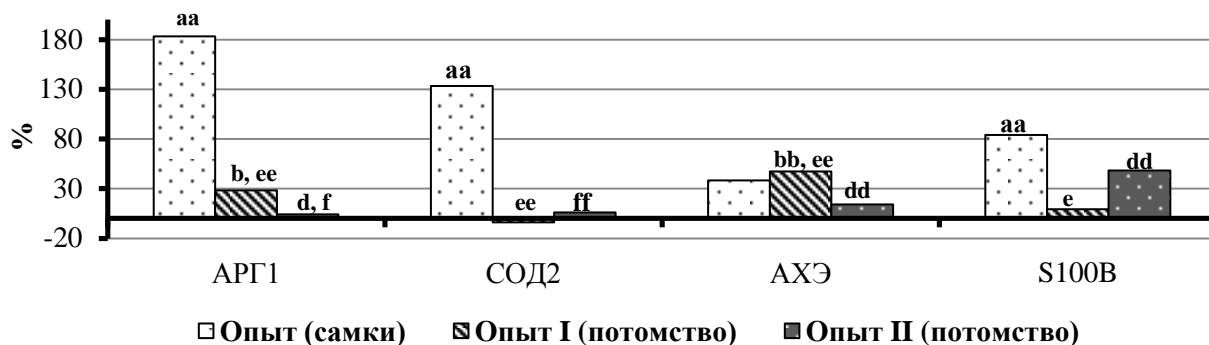


Рисунок 21 – Относительные значения содержания марганецсодержащих ферментов и нейроспецифических показателей животных опытных групп по сравнению с контролем

Примечание – Ось X (0) – уровень биохимических показателей в контрольной группе; aa – ( $p \leq 0,01$ ) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп самок; b – ( $p \leq 0,05$ ); bb – ( $p \leq 0,01$ ) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп потомства I; d – ( $p \leq 0,05$ ); dd – ( $p \leq 0,01$ ); – p-уровень при сравнении опытной группы II (потомство) с опытной группой I (потомство); e – ( $p \leq 0,05$ ); ee – ( $p \leq 0,01$ ) – p-уровень при сравнении опытной группы I (потомство) с опытной группой (самки); f – ( $p \leq 0,05$ ), ff – ( $p \leq 0,01$ ) – p-уровень при сравнении опытной группы II (потомство) с опытной группой (самки).

Таким образом, в ходе анализа было установлено, что хроническое пероральное воздействие Mn способствует повышению содержания в сыворотке крови белка S100B. Несмотря на отсутствие прямого воздействия Mn на животных второго поколения, у особей данной группы отмечается тенденция к увеличению уровня S100B. При пренатальном воздействии происходит увеличение уровня в крови АХЭ.

#### 4.5 Особенности валового содержания химических элементов в сыворотке крови лабораторных животных

Следующим этапом работы явилось изучение эффектов перорального и пренатального воздействия Mn в двух поколениях на содержание химических элементов в различных биосубстратах, а именно в сыворотке крови и коре головного мозга лабораторных животных.

Полученные результаты содержания макро- и микроэлементов в сыворотке крови крыс представлены в таблице Г.1 (приложение Г).

Для наглядности результаты анализа представлены в виде графика (рисунок 22).

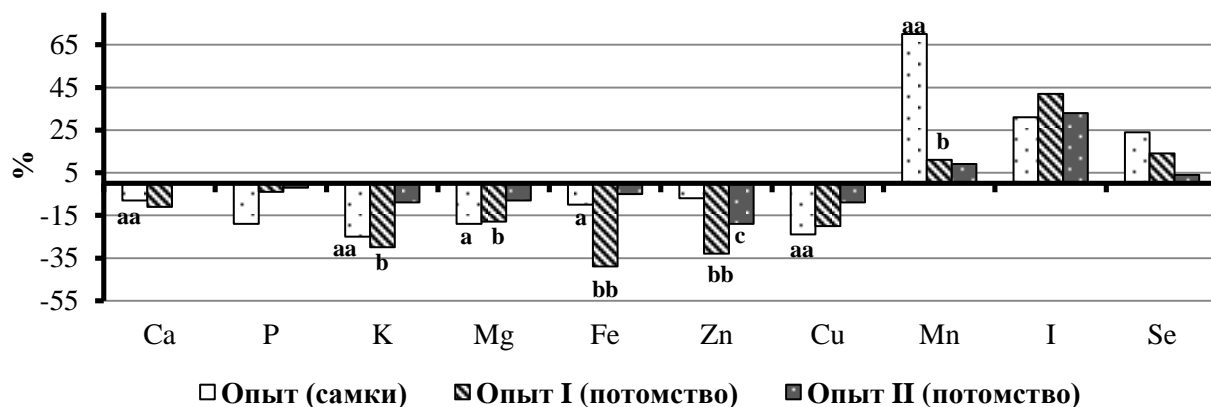


Рисунок 22 – Относительные значения содержания химических элементов в сыворотке крови животных опытных групп по сравнению с контролем, %

Примечание – Ось X (0) – уровень биохимических показателей в контрольной группе; a – ( $p \leq 0,05$ ); aa – ( $p \leq 0,01$ ) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп самок; b – ( $p \leq 0,05$ ); bb – ( $p \leq 0,01$ ) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп потомства I; c – ( $p \leq 0,05$ ) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп потомства II.

*Макроэлементы.* Сравнительный анализ содержания макроэлементов в сыворотке крыс выявил, что уровень Ca, K и Mg был статистически значимо ниже в опытной группе (самки) – значение  $Q_{75}$  опыта меньше  $Q_{25}$  контроля на 5 % ( $p=0,003$ ) и 20 % ( $p=0,002$ ), соответственно; на 8 % ( $p=0,003$ ), 25 % ( $p=0,002$ ) и 19 % ( $p=0,03$ ), соответственно, при сравнении значений медиан. Отмечалась тенденция к снижению P.

У животных опытной группы первого поколения Уровень K и Mg был статистически значимо ниже –  $Q_{75}$  опыта I (потомство) меньше  $Q_{25}$  контроля I (потомство) на 24 % ( $p=0,03$ ) и 15 % ( $p=0,05$ ), соответственно; на 30 % ( $p=0,03$ ) и 18 % ( $p=0,05$ ) при сравнении медиан. Отмечалась тенденция к снижению Ca.

У животных второй опытной группы наблюдалась слабая тенденция к снижению уровня K и Mg в сыворотке крови.

*Жизненно необходимые элементы.* Оценивая содержание эссенциальных элементов в сыворотке крови лабораторных животных было отмечено, что уровень Mn был достоверно выше в группе, подвергавшейся пероральному воздействию –  $Q_{25}$  опыта (самки) больше  $Q_{75}$  контроля (самки) на 15 % ( $p=0,01$ ); на 70 % ( $p=0,01$ ) при сравнении медиан. Содержание же Cu и Fe у животных

опытной группы (самки) было достоверно ниже –  $Q_{75}$  опыта (самки) меньше  $Q_{25}$  интактных животных на 6,5 % ( $p=0,003$ ) и 3 % ( $p=0,02$ ), соответственно; на 24 % ( $p=0,003$ ) и 10 % ( $p=0,02$ ) при сравнении значений медиан. Отмечалась слабая тенденция к снижению Zn на фоне отчетливой тенденции к повышению Se и I.

Среди жизненно необходимых микроэлементов у животных первой опытной группы было выявлено, что уровень Mn в сыворотке крови был больше контрольных значений –  $Q_{25}$  опыта I (потомство) практически наравне с  $Q_{25}$  контроля I (потомство) ( $p=0,05$ ); больше на 11 % ( $p=0,05$ ) при сравнении значений медиан. На фоне этого, содержание Fe и Zn было достоверно ниже –  $Q_{75}$  опыта I (потомство) меньше  $Q_{25}$  контроля I (потомство) на 29 % ( $p=0,002$ ) и 9 % ( $p=0,002$ ), соответственно; на 39 % ( $p=0,002$ ) и 33 % ( $p=0,002$ ) при сравнении медиан; фиксировалась четкая тенденция к снижению содержания Cu на фоне тенденции к повышению Se и I.

Среди эссенциальных элементов у животных второй опытной группы было обнаружено, что только уровень Zn в сыворотке крови был статистически значимо ниже – значение  $Q_{75}$  опыта II (потомство) меньше  $Q_{25}$  контроля II (потомство) на 28 % ( $p=0,02$ ); на 19 % ( $p=0,02$ ) при сравнении медиан. Отмечалась слабая тенденция к снижению Cu на фоне повышения I.

На основании полученных данных о химическом составе сыворотки крови был сформирован элементный профиль лабораторных животных. В числителе приведены элементы, содержание которых достоверно повышено по сравнению с контролем, а в знаменателе – элементы, содержание которых достоверно снижено по сравнению с контрольной группой.

$$\text{Опытная группа (самки)} = \frac{\text{Mn} \uparrow}{\text{Ca, K, Mg, Cu, Fe} \downarrow}$$

$$\text{Опытная группа I (потомство)} = \frac{\text{Mn} \uparrow}{\text{K, Mg, Fe, Zn} \downarrow}$$

$$\text{Опытная группа II (потомство)} = \frac{-}{\text{Zn} \downarrow}$$



Таким образом, элементный анализ показал, что длительное пероральное воздействие Mn приводит к нарушению гомеостаза целого ряда элементов – в сыворотке крови повышается уровень Mn фоне снижения Ca, K, Mg, Cu и Fe. Пренатальное воздействие Mn также отразилось на минеральном обмене животных – наблюдается повышение Mn в крови, сопровождающееся более выраженным снижением K, Mg, Fe и Zn. У животных второго поколения, несмотря на отсутствие прямого фактора воздействия, выявляются отклонения в содержании Zn. Следует отметить, что дисбаланс химических элементов в организме непосредственно влияет на функционирование практически всех систем и органов, вызывая значительное напряжение адаптационных механизмов (Авцын и др., 1991).

#### **4.6 Особенности валового содержания химических элементов в коре головного мозга лабораторных животных**

Доказано, что изменение уровня макро- и микроэлементов в головном мозге является фактором риска развития различных болезней, включая болезнь Альцгеймера, Паркинсона или Хантингтона (Grochowski C. et al., 2019; Mezzaroba L. et al., 2019). В связи с этим, следующим этапом работы стало изучение содержания химических элементов в головном мозге лабораторных животных, а именно в сером веществе. Повышенная чувствительность к токсичным факторам воздействия фило- и онтогенетически более молодых и высоко расположенных отделов мозга по сравнению с более древними и ниже расположенными является общей закономерностью для центральной нервной системы, в связи с чем был проанализирован элементный состав коры головного мозга (Аврущенко М.Ш. и др., 2009) Данный выбор также обосновывается тем, что кора головного мозга, в частности лобных и теменных долей играет ведущую роль как в процессах обучения и памяти, так и в контроле двигательной активности (Lazrishvili I.L. et al., 2009).

Полученные результаты содержания химических элементов в коре головного мозга представлены в таблице Д.1 (приложение Д).

Для наглядности результаты анализа представлены в виде графика (рисунок 23).

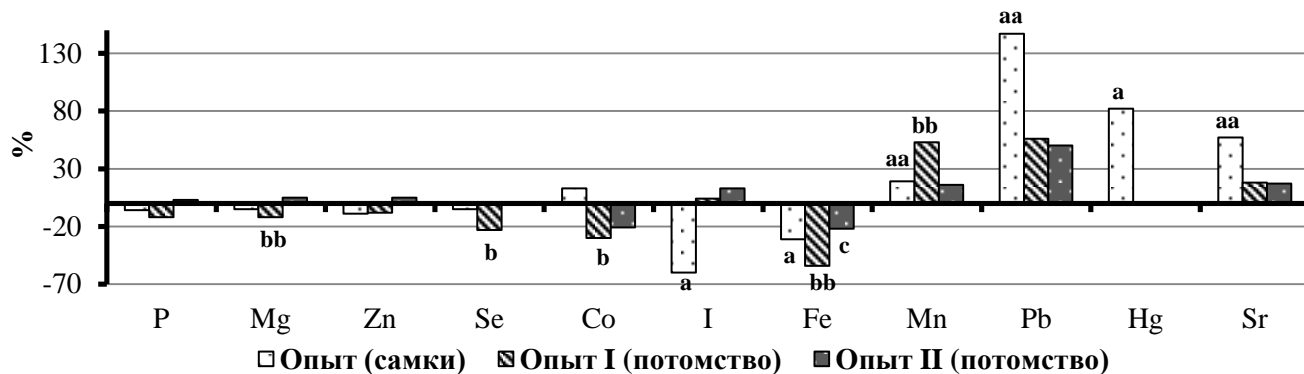


Рисунок 23 – Относительные значения содержания химических элементов в коре головного мозга животных опытных групп по сравнению с контролем, %

Примечание – Ось X (0) – уровень биохимических показателей в контрольной группе; aa – ( $p \leq 0,01$ ) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп самок; b – ( $p \leq 0,05$ ); bb – ( $p \leq 0,01$ ) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп потомства I; c – ( $p \leq 0,05$ ) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп потомства II.

*Макроэлементы.* Сравнительный анализ содержания макроэлементов в коре головного мозга крыс опытной группы (самки) и контрольной (самки) не выявил достоверных различий. Однако отмечалась слабая тенденция к снижению уровня Са.

При сравнении содержания макроэлементов в опытной группе I (потомство) с контролем I (потомство) было зафиксировано статистически значимое различие только в содержании Mg, уровень которого был ниже, чем в контроле –  $Q_{75}$  опыта I меньше  $Q_{25}$  контроля I на 4 % ( $p=0,01$ ); на 12 % ( $p=0,01$ ) при сравнении значений медиан. Отмечалась тенденция к снижению Р.

У животных опытной группы II отмечалась слабая тенденция к повышению содержания К и Na при сравнении контролем II.

*Жизненно необходимые элементы.* При оценке содержания эссенциальных элементов в коре головного мозга было отмечено, что у животных опытной группы (самки) уровень Mn был статистически значимо выше контрольных значений –  $Q_{25}$  опыта (самки) больше  $Q_{75}$  контроля (самки) на 6 % ( $p=0,002$ ), на 19 % ( $p=0,002$ ) при сравнении значений медиан. На фоне этого уровень I у

животных данной группы был статистически значимо ниже –  $Q_{75}$  опыта (самки) меньше  $Q_{25}$  контроля (самки) 46 % ( $p=0,03$ ); на 60 % ( $p=0,03$ ) при сравнении значений медиан. Отмечалась тенденция к снижению Cu.

У опытных животных первого поколения отмечалось накопление Mn в коре головного мозга –  $Q_{25}$  опыта I (потомство) больше  $Q_{75}$  контроля I (потомство) на 23 % ( $p=0,002$ ); на 53 % ( $p=0,002$ ) при сравнении значений медиан. На фоне этого уровень Fe, Co и Se ниже контрольных значений на 27 % ( $p=0,003$ ), 18 % ( $p=0,02$ ) и 15 % ( $p=0,03$ ) при сравнении 75-го и 25-го центилей, соответственно; на 54 % ( $p=0,003$ ), 30 % ( $p=0,02$ ) и 23 % ( $p=0,03$ ) при сравнении значений медиан. Отмечалась слабая тенденция к снижению Zn.

У животных опытной группы второго поколения было зафиксировано достоверно более низкое содержание Fe – ниже на 22 % ( $p=0,03$ ) относительно соответствующего контроля при сравнении значений медиан. Отмечалась тенденция к повышению уровня Mn на фоне тенденции к снижению Co.

*Условно жизненно необходимые и токсичные элементы.* Сравнительный анализ содержания условно жизненно необходимых и токсичных микроэлементов в коре головного мозга крыс опытной группы (самки) и контрольной группы (самки) выявил достоверные различия в концентрациях Pb, Hg и Sr. Уровни данных элементов статистически значимо превышали контрольные значения самок крыс –  $Q_{25}$  опытной группы (самки) больше  $Q_{75}$  контроля (самки) на 16 % ( $p=0,002$ ), 55 % ( $p=0,05$ ) и 29 % ( $p=0,003$ ), соответственно; на 147 % ( $p=0,002$ ), 82 % ( $p=0,05$ ) и 57 % ( $p=0,003$ ) при сравнении значений медиан.

У животных опытной группы I (потомство) отмечалась выраженная тенденция к повышению содержания Pb и Sr в коре головного мозга.

На основании полученных данных был сформирован элементный профиль коры головного мозга животных опытных групп по сравнению с контрольной. В числителе приведены элементы, содержание которых достоверно повышено по сравнению с контролем, а в знаменателе – элементы, содержание которых достоверно снижено по сравнению с контрольной группой.

$$\text{Опытная группа (самки)} = \frac{\text{Mn, Pb, Hg, Sr} \uparrow}{\text{Fe, I} \downarrow}$$

$$\text{Опытная группа I (потомство)} = \frac{\text{Mn} \uparrow}{\text{Mg, Fe, Co, Se} \downarrow}$$

$$\text{Опытная группа II (потомство)} = \frac{-}{\text{Fe} \downarrow}$$

Подводя итог полученным результатам, можно констатировать, что наибольшие изменения в содержании макро- и микроэлементов произошли в тканях головного мозга самок крыс, подвергшихся пероральному воздействию Mn. Данные изменения сопровождались достоверным накоплением Mn, Pb, Hg и Sr на фоне снижения содержания Fe и I. Следует отметить, что увеличивалось непосредственно накопление токсичных металлов в коре головного мозга. У животных опытной группы I (потомство) были зафиксированы изменения в распределении эссенциальных элементов. Уровень Fe, Co, Se, а также макроэлемента Mg был ниже контрольных значений. У животных опытной группы II (потомство) было выявлено наименьшее число изменений. Однако отмечалось достоверное снижение уровня Fe.

#### **4.7 Особенности распределения химических форм марганца в сыворотке крови лабораторных животных**

Известно, что Mn химически достаточно активен, поэтому в организме он стабилизируется в комплексе с различными лигандами (Michalke et al., 2015). В связи с этим нами был проведен анализ химических форм Mn («Speciation analysis»). Установление природы химических форм Mn в сыворотке крови является ценным источником информации о транспорте, распределении и превращениях данного металла в живом организме.

У крыс линии Wistar было выявлено четыре марганецсодержащих фракций: α2-макроглобулин (Mn-A2M), трансферрин/альбумин (Mn-Tf/Alb),

низкомолекулярные соединения (Mn-LMM) и свободный неорганический марганец (Mn-free). В таблице 20 представлены полученные результаты по содержанию металл-лигандных форм марганца.

Таблица 20 – Показатели (Me (Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub>)) содержания марганцевых фракций в сыворотке крови лабораторных животных, мкг/л

Группы	Фракции Mn				
	Mn-A2M	Mn-Tf/Alb	Mn-LMM	Mn-free	Общее содержание
<b>Контроль (самки)</b>	1,0 (0,9-1,1)	1,7 (1,5-1,8)	0,1 (0,087-0,2)	3,6 (2,5-4,0)	6,4 (5,0-7,0)
<b>Опыт (самки)</b>	0,69 (0,5-0,75)	3,1 (2,8-3,9) <sup>aa</sup>	0,4 (0,35-0,7) <sup>a</sup>	6,6 (4,6-7,2)	10,9 (8,2-12,2) <sup>aa</sup>
<b>Контроль I (потомство)</b>	1,2 (1,0-1,4)	2,4 (2,0-2,2)	0,2 (0,1-0,3)	4,2 (3,8-4,6)	8,0 (7,0-8,7)
<b>Опыт I (потомство)</b>	0,96 (0,42-1,08)	2,8 (2,4-2,9) <sup>b</sup>	0,28 (0,13-0,35)	4,8 (4,0-5,3)	8,9 (6,7-10,8) <sup>b</sup>
<b>Контроль II (потомство)</b>	0,8 (0,7-0,9)	1,3 (1,1-1,4)	0,1 (0,08-0,22)	2,8 (2,7-3,0)	5,0 (4,8-5,3)
<b>Опыт II (потомство)</b>	1,0 (0,8-1,2) <sup>ff</sup>	1,6 (1,3-1,9) <sup>d, f</sup>	0,1 (0,07-0,19) <sup>dd, ff</sup>	3,3 (2,7-3,7) <sup>dd</sup>	6,0 (5,0-7,0)

Примечание – a – (p≤0,05); aa – (p≤0,01) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп самок; b – (p≤0,05) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп потомства I; d – (p≤0,05), dd – (p≤0,01) – p-уровень при сравнении опытной группы II (потомство) с опытной группой I (потомство); f – (p≤0,05); ff – (p≤0,01) – p-уровень при сравнении опытной группы II (потомство) с опытной группой (самки).

При рассмотрении значений медиан было обнаружено, что у самок крыс контрольной группы примерно 2,8 мкг/л Mn связывалось с органическими частицами. Из этого числа 1,0 мкг/л Mn связывалось с фракцией, молекулярная масса которой была более 150 кДа (Mn-α<sub>2</sub>-макроглобулин); около 1,7 мкг/л Mn связывалось с фракцией массой 70-80 кДа (Mn-трансферрин/альбумин); 0,1 мкг/л Mn связывалось с низкомолекулярными соединениями, масса которых составляла от 0,7 до 4 кДа (Mn-цитрат и комплексы Mn-аминокислоты). Оставшаяся часть (3,6 мкг/л Mn) представляла собой несвязанный неорганический марганец, масса которого не превышала 0,6 кДа.

Содержание фракций Mn в сыворотке крови животных, подвергшихся пероральному воздействию, отличалось от контрольной группы. Общее содержание Mn в сыворотке опытных животных (самки) статистически значимо превышало контроль в 1,7 раз (p=0,01). Было обнаружено, что основное

количество Mn было представлено неорганической формой (6,6 мкг/л), которое было больше контрольных значений в 1,8 раза. Среди органических форм было зафиксировано, что уровень Mn-LMM и Mn-Tf/Alb достоверно больше контроля в 4 раза ( $p=0,04$ ) и 1,9 раза ( $p=0,005$ ), соответственно. На фоне этого отмечалась тенденция к снижению содержания фракции Mn-A2M.

Для наглядности полученные результаты представлены в виде графика (рисунок 24).

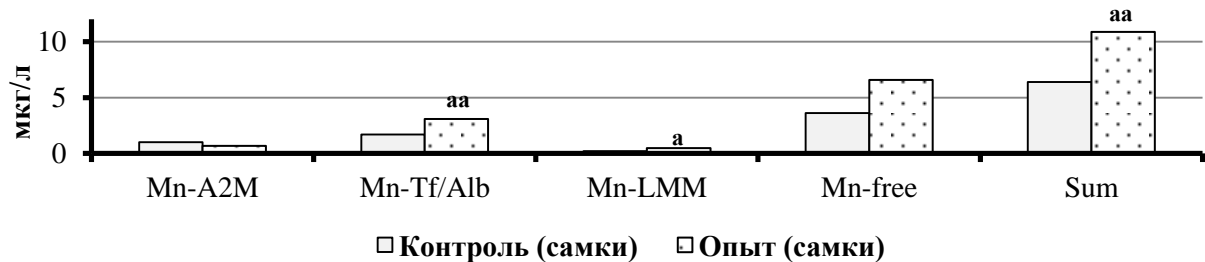


Рисунок 24 – Уровень марганцевых фракций в сыворотке крови самок крыс, мкг/л  
Примечание – Данные представлены по значениям медиан; а – ( $p \leq 0,5$ ); aa – ( $p \leq 0,01$ ) – р-уровень при сравнении опытной и контрольной групп самок.

Процентное распределение металло-лигандных форм в сыворотке крови крыс опытной группы (самки) подверглось следующим изменениям (рисунок 25).

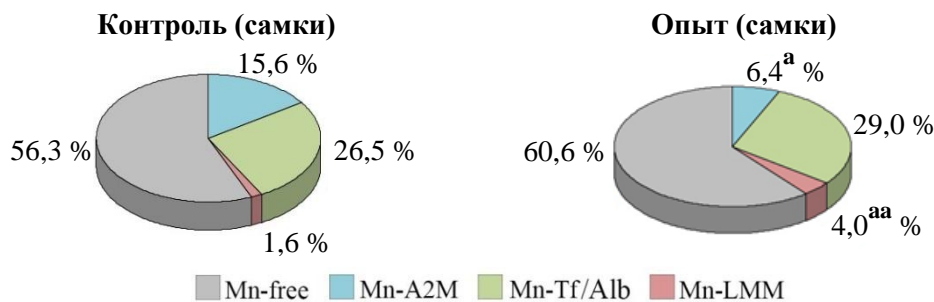


Рисунок 25 – Процентное распределение марганца по фракциям в сыворотке крови животных, %

Примечание – Данные представлены по значениям медиан; а – ( $p \leq 0,5$ ); aa – ( $p \leq 0,01$ ) – р-уровень при сравнении опытной и контрольной групп самок.

Как было показано, несвязанный неорганический марганец был основной формой металла, процентное содержание которого незначительно увеличилось в опытной группе при сравнении с контролем на 5 %. Интересно отметить, что у животных опытной группы (самки) прослеживалось достоверное снижение относительного содержания фракции Mn-A2M (ниже на 9 %) на фоне повышения

Mn-LMM (выше на 2 %). Также отмечалась тенденция к увеличению процентного содержания Mn-Tf/Alb.

Таким образом, анализ показал, что пролонгированное пероральное воздействие Mn способствует повышению валового содержания данного металла в сыворотке крови, инициируя при этом перераспределение Mn по его металл-лигандным формам.

Наиболее интересные результаты при анализе видообразования Mn были получены у животных опытной группы I (потомство) (рисунок 26). У животных опытной группы I (потомство) установлено, что общее содержание Mn в сыворотке крови было достоверно чуть выше контрольных значений. Однако, несмотря на это, были выявлены изменения в содержании его металл-лигандных форм. Уровень фракции Mn-Tf/Alb был статистически значимо больше, чем у животных контрольной группы в 1,2 ( $p=0,05$ ) раза, также отмечалась тенденция к увеличению Mn-LMM. На фоне этого фиксировалась тенденция к снижению содержания высокомолекулярных фракций Mn-A2M.

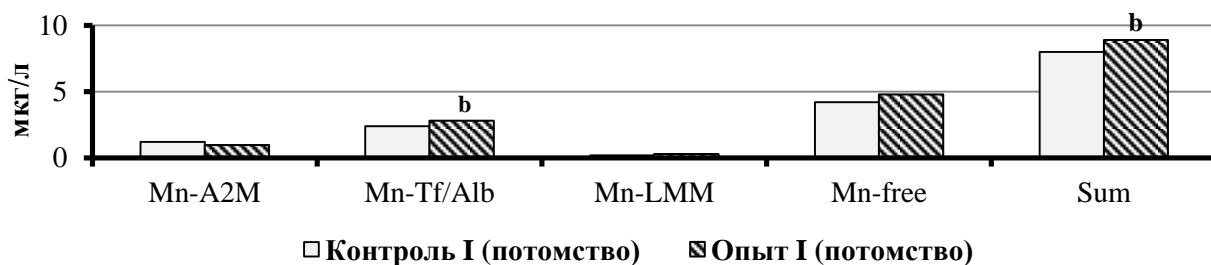


Рисунок 26 – Уровень марганцевых фракций в сыворотке крови животных первого поколения, мкг/л

Примечание – b – ( $p \leq 0,05$ ) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп потомства I.

При рассмотрении процентного распределения Mn по формам были выявлены следующие отклонения от контрольной группы I (потомство) (рисунок 27).

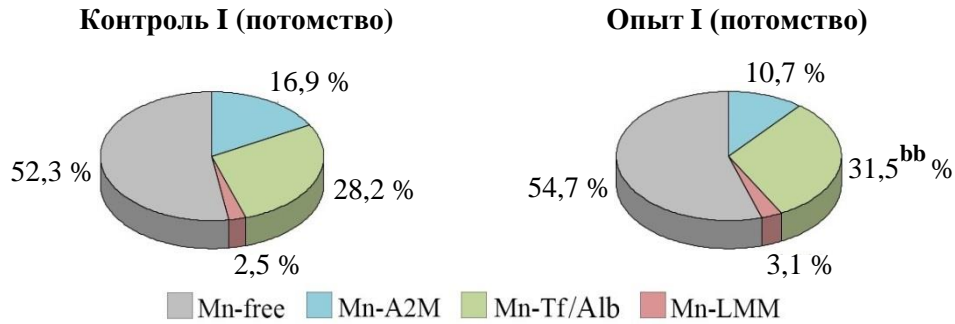


Рисунок 27 – Процентное распределение марганца по фракциям в сыворотке крови животных первого поколения, %

Примечание – bb – ( $p \leq 0,01$ ) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп потомства I.

У животных опытной группы второго поколения не было выявлено изменений в содержании марганцевых форм относительно соответствующего контроля. Таким же образом не отмечалось изменений и в процентном распределении форм Mn (рисунок 28).

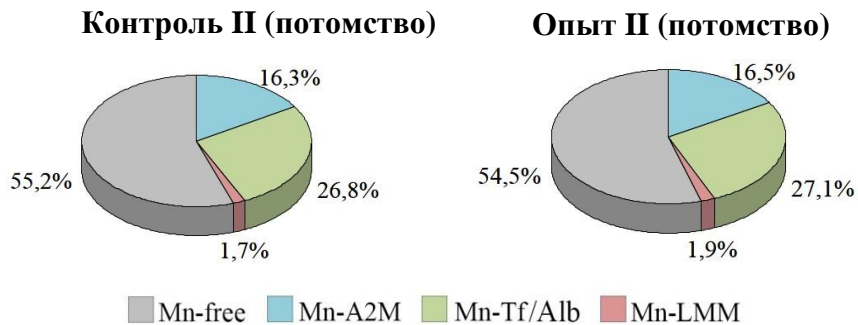


Рисунок 28 – Процентное распределение марганца по фракциям в сыворотке крови животных первого поколения, %

Таким образом, полученные результаты наглядно демонстрируют, что длительное воздействие субтоксических доз Mn может привести к смещению его металл-лигандных форм в сторону низкомолекулярных соединений, а также неорганической фракции, что может быть связано с перегрузкой других транспортных молекул.

Резюмируя полученные данные, можно заключить, что воздействие Mn оказывает негативное влияние на клинические и биохимические показатели крови, элементный состав различных биосубстратов лабораторных животных



независимо от способа поступления данного тяжелого металла в организм. Пероральное и пренатальное воздействие Mn влияет на показатели углеводного, белкового и липидного обменов, что сопровождается достоверным увеличением уровня глюкозы, холестерина и триглицеридов на фоне снижения общего белка и альбумина.

Наиболее выраженные изменения в уровнях марганецсодержащих ферментов отмечаются у самок крыс на фоне перорального воздействия Mn и характеризуются увеличением уровня СОД2 и АРГ1, что, возможно, носит адаптационно-компенсаторный механизм на избыточное поступление металла. У взрослых животных первого поколения, подвергшихся в период пренатального развития воздействию Mn, отмечается более высокий уровень АРГ1, опосредованный, возможно, интенсивными катаболическими процессами белка. Хроническое пероральное воздействие Mn оказывает нейротоксическое действие, что подтверждается увеличением содержания белка S100B в сыворотке крови животных. Пренатальное воздействие Mn оказывает негативный эффект на функционирование холинергической системы, что подтверждается повышенным содержанием АХЭ в сыворотке крови животных первого поколения.

Хроническое пероральное поступление Mn в пред- и гестационный периоды способствует нарушению гомеостаза целого ряда элементов (K, Mg, Mn, Fe, Cu, Zn) в сыворотке крови и коре головного мозга материнского организма и их потомства. Наибольшее число отклонений наблюдается при пероральном воздействии Mn, однако степень выраженности изменений выше у животных первого поколения. На фоне повышения валового содержания Mn в сыворотке крови происходит перераспределение данного металла по его металл-лигандным формам. При содержании Mn в сыворотке крови крыс выше 12 мкг/л происходит смещение уровней марганцевых фракций в сторону низкомолекулярных соединений, что может быть связано с перегрузкой транспортных молекул.

## **ГЛАВА 5. ОСОБЕННОСТИ ИНТЕГРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В ОРГАНИЗМЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ НА ФОНЕ СТРЕССОРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ МАРГАНЦА**

Макро- и микроэлементы играют ключевую роль в поддержании оптимальной активности функциональных систем организма, поскольку они вовлечены в сохранение структурного и функционального равновесия клетки, в работу специфических ферментов и неферментативных кофакторов организма, тем самым обеспечивая регуляцию ряда биохимических процессов (Оберлис Д. и др., 2018). В этой связи особый интерес представляет выявление взаимосвязей между содержанием элементов в различных биосубстратах с морфобиохимическими параметрами крови.

### **5.1 Интегральные взаимосвязи уровня химических элементов сыворотки крови и коры головного мозга с гематологическими и биохимическими показателями крови лабораторных животных**

Учитывая, что большинство макро- и микроэлементов являются неотъемлемой частью различных ферментных систем, интерес представляют данные о возможном влиянии Mn на характер взаимосвязи между показателями элементного статуса животных с гематологическими и биохимическими параметрами крови.

В ходе проведенного корреляционного анализа между химическими элементами сыворотки и морфобиохимическими показателями крови в опытных группах был выявлен ряд ассоциаций, сила и количество которых были максимальными при пероральном поступлении данного металла. Однако, абсолютно во всех опытных группах, были зафиксированы достоверные положительные корреляции ( $r \geq 0,3$  при  $p \leq 0,05$ ) между гемоглобином крови и сывороточным Fe, эритроцитами и Zn, лейкоцитами и Cu, что указывает на ключевую роль данных микроэлементов в кроветворении и согласуется с их

физиологической значимостью. Обращает на себя внимание факт, что у самок опытной группы на фоне перорального воздействия Mn отмечались более низкие уровни представленных микроэлементов (Fe, Zn и Cu) в сыворотке крови, что сопровождалось снижением уровня гемоглобина, лейкоцитов и нейтрофилов. Таким образом, нарушение гомеостаза химических элементов может оказать влияние на процессы дифференцировки, пролиферации и функционирование клеток крови.

Вне зависимости от способа воздействия Mn, во всех опытных группах был обнаружен ряд статистически значимых ассоциаций между химическими элементами и биохимическими показателями. В ходе анализа была установлена достоверная ассоциация между глюкозой и Mn, общим белком и Mg, холестерином и Zn ( $r \geq 0,3$ ;  $p \leq 0,05$ ). Установленные корреляционные зависимости наглядно демонстрируют значимость влияния данных микроэлементов на углеводный, липидный и белковый обмены.

## 5.2 Интегральные взаимосвязи уровня химических элементов сыворотки крови и коры головного мозга с марганецсодержащими ферментами и нейроспецифическими показателями лабораторных животных

Анализ корреляционной матрицы между содержанием ARG1, СОД2, АХЭ, S100В и уровнем элементов в сыворотке крови выявил следующие достоверные ассоциации (рисунок 29).

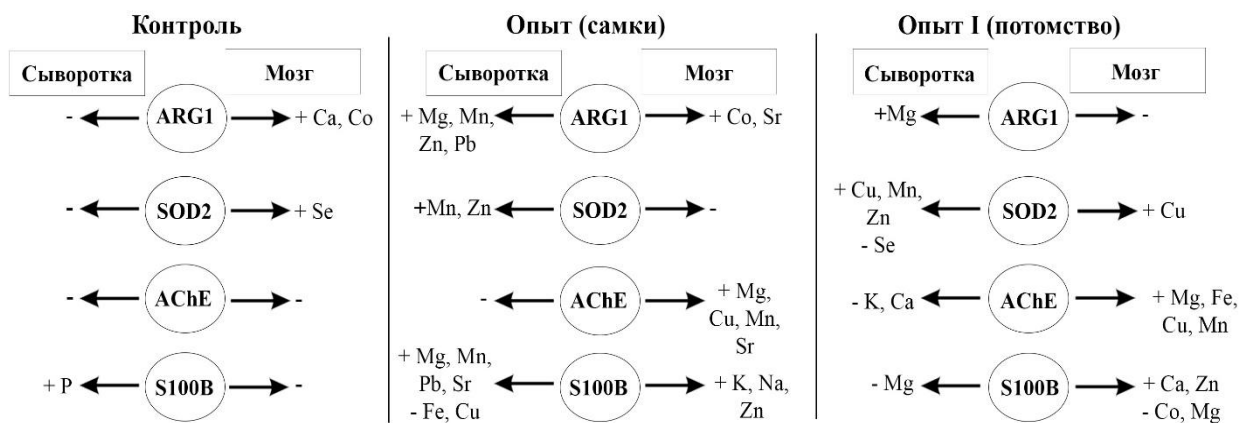


Рисунок 29 – Корреляционная связь между химическими элементами в сыворотке крови и мозге животных и сывороточным уровнем ARG1, СОД2, АХЭ, S100В

Как видно из представленного рисунка, в опытной группе (самки) содержание АРГ1 положительно коррелировало с сывороточным Mg ( $r=0,8$  при  $p=0,03$ ), Mn ( $r=0,79$  при  $p=0,04$ ), Zn ( $r=0,8$  при  $p=0,03$ ) и Pb ( $r=0,7$  при  $p=0,04$ ). Фермент СОД2 статистически значимо положительно ассоциировался с Mn ( $r=0,69$  при  $p=0,05$ ) и Zn ( $r=0,62$  при  $p=0,03$ ). Что касается белка S100B, то у опытных самок крыс была выявлена положительная взаимосвязь с Mg ( $r=0,69$  при  $p=0,03$ ), Mn ( $r=0,7$  при  $p=0,04$ ), Pb ( $r=0,75$  при  $p=0,04$ ) и Sr ( $r=0,8$  при  $p=0,004$ ) на фоне отрицательной корреляции с Fe ( $r=-0,75$  при  $p=0,03$ ) и Cu ( $r=-0,85$  при  $p=0,03$ ).

У животных опытной группы I (потомство) было зафиксировано меньшее количество статистически достоверных корреляционных взаимосвязей по сравнению с опытной группой (самки). Так АРГ1 достоверно положительно ассоциировалась с Mg ( $r=0,58$  при  $p=0,05$ ). Содержание СОД2 положительно коррелировало с сывороточным Cu ( $r=0,79$  при  $p=0,03$ ), Mn ( $r=0,87$  при  $p=0,02$ ) и Zn ( $r=0,62$  при  $p=0,02$ ), отрицательно с Se ( $r=-0,7$  при  $p=0,04$ ). Содержание АХЭ отрицательно ассоциировалось с Ca ( $r=-0,73$  при  $p=0,03$ ) и K ( $r=-0,7$  при  $p=0,03$ ) сыворотки крови. Содержание белка S100B отрицательно коррелировало с Mg ( $r=-0,8$  при  $p=0,03$ ).

У животных опытной группы II (потомство) было выявлено наименьшее количество корреляционных зависимостей. Установлено, что АРГ1 и белок S100B положительно коррелировали с сывороточным Mg ( $r=0,82$  при  $p=0,03$ ).

Анализ корреляционной матрицы между содержанием АРГ1, СОД2, АХЭ, S100B и уровнем элементов в коре головного мозга выявил следующее. В опытной группе (самки) содержание АРГ1 положительно коррелировало с Co ( $r=0,76$  при  $p=0,05$ ) и Sr ( $r=0,72$  при  $p=0,03$ ); АХЭ положительно ассоциировался с Mg ( $r=0,45$  при  $p=0,05$ ), Cu ( $r=0,33$  при  $p=0,05$ ), Mn ( $r=0,66$  при  $p=0,03$ ) и Sr ( $r=0,89$  при  $p=0,02$ ); белок S100B имел положительную взаимосвязь с K, Na и Zn ( $r=0,65$  при  $p=0,05$ ).

В опытной группе I (потомство) была выявлена достоверная корреляция между СОД2 и Cu ( $r=0,32$  при  $p=0,05$ ); АХЭ положительно коррелировал с Mg

( $r=0,82$  при  $p=0,01$ ), Fe ( $r=0,7$  при  $p=0,03$ ) и Cu ( $r=0,36$  при  $p=0,05$ ); белок S100B был положительно взаимосвязан с Ca ( $r=0,37$  при  $p=0,002$ ) и Zn ( $r=0,42$  при  $p=0,04$ ), отрицательно с Mg ( $r=-0,88$  при  $p=0,03$ ) и Co ( $r=-0,7$  при  $p=0,04$ ).

В опытной группе II (потомство) АХЭ отрицательно ассоциировался с К ( $r=0,85$  при  $p=0,05$ ), белок S100B отрицательно коррелировал с К ( $r=0,87$  при  $p=0,02$ ) и I ( $r=0,72$  при  $p=0,05$ ).

Таким образом, проведенный корреляционный анализ показал, что пероральное и пренатальное воздействие Mn способствует нарушению гомеостаза целого ряда элементов в сыворотке крови и тканях головного мозга. Согласно корреляционному анализу, максимальное количество ассоциаций наблюдалось на фоне перорального воздействия Mn.

### **5.3 Интегральные взаимосвязи уровня химических элементов в сыворотке крови и коре головного мозга лабораторных животных**

Особый интерес представляет выявление взаимосвязей содержания химических элементов в различных биосубстратах. Учитывая важность содержания макро- и микроэлементов в коре головного мозга, был проведен корреляционный анализ содержания химических элементов в сыворотке крови и сером веществе лабораторных животных, благодаря чему можно судить по показателям крови о состоянии минерального обмена в мозге.

Согласно результатам наших исследований, выявленные ассоциации во всех контрольных группах были идентичны, поэтому при проведении корреляционного анализа базы данных элементного состава были объединены (таблица 21).

Как видно из представленной таблицы в опытной группе (самки) сывороточный Mn достоверно положительно ассоциировался с Mn коры головного мозга ( $r=0,78$  при  $p=0,01$ ), а также с К ( $r=0,76$  при  $p=0,003$ ) и Na ( $r=0,92$  при  $p=0,002$ ). На фоне этого отмечалась отрицательная корреляционная связь между Mn и Cr ( $r=-0,78$  при  $p=0,01$ ). Помимо этого, была выявлена статистически

значимая взаимосвязь между макроэлементами сыворотки крови и коры головного мозга: Ca и Na ( $r=-0,85$  при  $p=0,002$ ), K и Na ( $r=-0,92$  при  $p=0,01$ ), K и P ( $r=-0,73$  при  $p=0,003$ ). Среди микроэлементов было обнаружено, что сывороточная Cu отрицательно коррелировала с Na головного мозга ( $r=-0,89$  при  $p=0,009$ ) и положительно ассоциировалась с Cu ( $r=0,89$  при  $p=0,01$ ); сывороточное Fe достоверно коррелировало Hg ( $r=-0,92$  при  $p=0,01$ ) и Mg ( $r=0,82$  при  $p=0,002$ ).

Таблица 21 – Взаимосвязь между элементами в сыворотке крови и головного мозга лабораторных животных (при  $r \geq 0,3$ ;  $p \leq 0,05$ )

		Контроль	Опыт (самки)	Опыт I (потомство)	Опыт II (потомство)
Головной мозг					
Сыворотка крови	Ca	- K	-Na	+ Co, Mn	
	K		-Na, P		-Ca, Mg
	Mg		+ Mg	+Na, Mg	+ Co, Mg
	Mn	- Co, Cr	- Cr + K, Na, Mn	- Fe + Ca, Mn	+ Ca
	Cu		-Na + Cu	+ Cu	+ Cu
	Fe	- Ca	-Hg + Mg	- I	- Ca, Mn
Примечание – Символ «-» – отрицательная корреляционная связь; символ «+» – положительная корреляционная связь.					

У животных опытной группы I (потомство) также была выявлена статистически значимая корреляционная связь между сывороточным Mn и Mn коры головного мозга ( $r=0,7$  при  $p=0,003$ ), а также Mn и Ca ( $r=0,77$  при  $p=0,01$ ), Mn и Fe ( $r=-0,76$  при  $p=0,01$ ). Среди макроэлементов отмечалась связь между сывороточным Ca и Co ( $r=0,9$  при  $p=0,002$ ), Ca и Mn ( $r=-0,77$ ), Mg и Na ( $r=0,78$  при  $p=0,01$ ), Mg и Mg ( $r=0,33$  при  $p=0,05$ ). Среди эссенциальных элементов сывороточная Cu положительно ассоциировалась с Cu коры головного мозга ( $r=0,78$  при  $p=0,002$ ), Fe отрицательно коррелировало с I ( $r=-0,85$  при  $p=0,01$ ).

У лабораторных животных второй опытной группы (потомство) было выявлено наименьшее число ассоциаций: сывороточный Mn достоверно коррелировал с Ca серого вещества ( $r=0,76$  при  $p=0,002$ ), Fe сыворотки крови ассоциировалось с Ca ( $r=-0,73$  при  $p=0,01$ ) и Mn ( $r=-0,81$  при  $p=0,004$ ) коры головного мозга. Среди макроэлементов была установлена взаимосвязь между K

сыворотки крови и Са мозга ( $r=-0,78$  при  $p=0,01$ ), К и Mg ( $r=-0,85$  при  $p=0,01$ ), а также Mg и Со ( $r=0,75$  при  $p=0,002$ ), Mg и Mg ( $r=0,55$  при  $p=0,02$ ).

Из таблицы наглядно видно, что хроническое пероральное воздействие Mn приводит к увеличению количества корреляционных связей между химическими элементами сыворотки крови и тканями коры головного мозга.

#### 5.4 Интегральные взаимосвязи металл-лигандных форм марганца с валовым содержанием данного элемента в сыворотке крови и коре головного мозга лабораторных животных

На данном этапе работы был проведен корреляционный анализ, направленный на выявление взаимосвязей между валовым содержанием Mn в сыворотке крови и его металл-лигандными формами.

Согласно анализу корреляционной матрицы, было выявлено, что уровень общего Mn в крови животных положительно коррелировал с такими фракциями, как Mn-free ( $r=0,5$ ;  $p=0,006$ ), Mn-Tf/Alb ( $r=0,5$ ;  $p=0,001$ ) и Mn-LMM ( $r=0,5$ ;  $p=0,005$ ), фиксировалась отрицательная ассоциация с Mn-A2M ( $r=-0,35$ ;  $p=0,02$ ). Из корреляционной матрицы видно, что повышение валового содержания Mn в сыворотке крови крыс (выше 12 мкг/л) приводит к перегрузке основных высокомолекулярных носителей и инициирует еще большее образование низкомолекулярных форм Mn (рисунок 30).

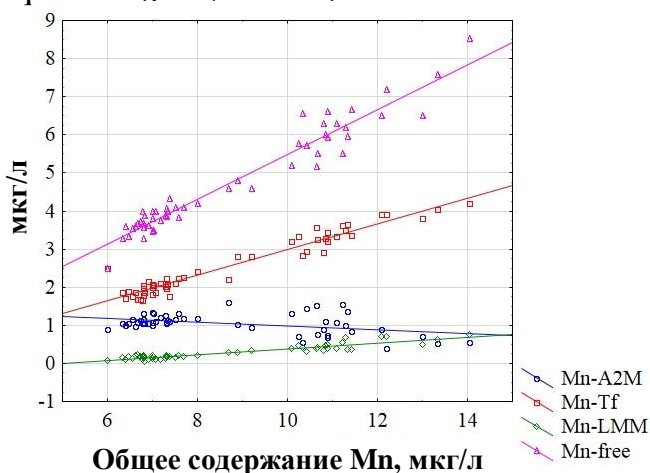


Рисунок 30 – График корреляционных зависимостей между общим содержанием Mn в сыворотке крови и его металл-лигандными формами

Выявленные фракции Mn в сыворотке крыс имели следующее распределение в зависимости от уровня данного металла в крови:

При содержании Mn в сыворотке крови ниже 12 мкг/л:

Mn-free >> Mn-Tf/Alb >> Mn-A2M >> **Mn-LMM**

При содержании Mn в сыворотке крови выше 12 мкг/л:

Mn-free >> Mn-Tf /Alb >> **Mn-LMM** >> Mn-A2M

Таким образом, полученные в ходе исследования данные свидетельствуют о том, что изменение уровня Mn в сыворотке крови сопровождается дозозависимым перераспределением данного элемента по различным белковым фракциям.

Предполагается, что именно Mn-LMM способны преодолевать гематоэнцефалический барьер и накапливаться в головном мозге, вызывая нейротоксический эффект. С целью проверки данной гипотезы нами был выполнен корреляционный анализ между содержанием в сыворотке крови Mn-LMM и его валовым содержанием в коре головного мозга. Из рисунка наглядно видно, что увеличение содержания Mn-LMM форм в крови сопровождается достоверным повышением общего уровня Mn в головном мозге ( $r=0,6$ ;  $p \leq 0,05$ ) (рисунок 31).

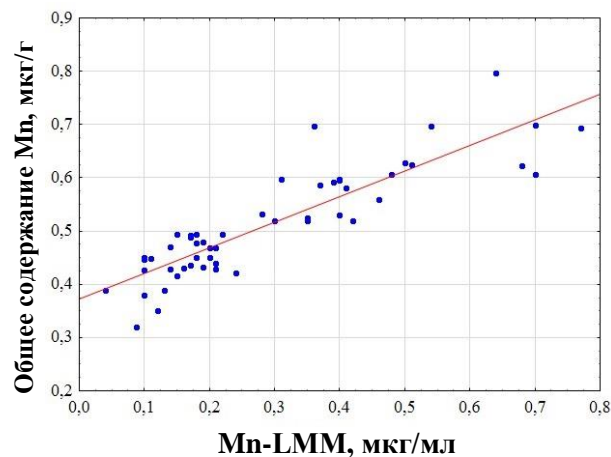


Рисунок 31 – График корреляционных зависимостей между уровнем низкомолекулярных форм марганца в сыворотке крови и его валовым содержанием в коре головного мозга

Полученные результаты указывают на то, что Mn-LMM проникают через гематоэнцефалический барьер более активно и накапливаются в мозге.



Таким образом, подводя итог данному этапу исследований можно заключить следующее, что при пероральном воздействии Mn было выявлено наибольшее количество корреляционных зависимостей значительной силы ( $r \geq 0,7$ ) между исследуемыми показателями, в то время как в опытной группе I (потомство) и опытной группе II (потомство) было зафиксировано меньшее количество ассоциаций умеренной силы ( $r \geq 0,3$ ). Однако, независимо от способа воздействия, во всех опытных группах были выявлены аналогичные корреляционные зависимости (рисунок 32). В отношении других параметров такой четкой зависимости, которая наблюдалась бы во всех группах, обнаружено не было. Вероятно, воздействие Mn, приводящее к изменению минерального гомеостаза, нарушает элементные взаимодействия.

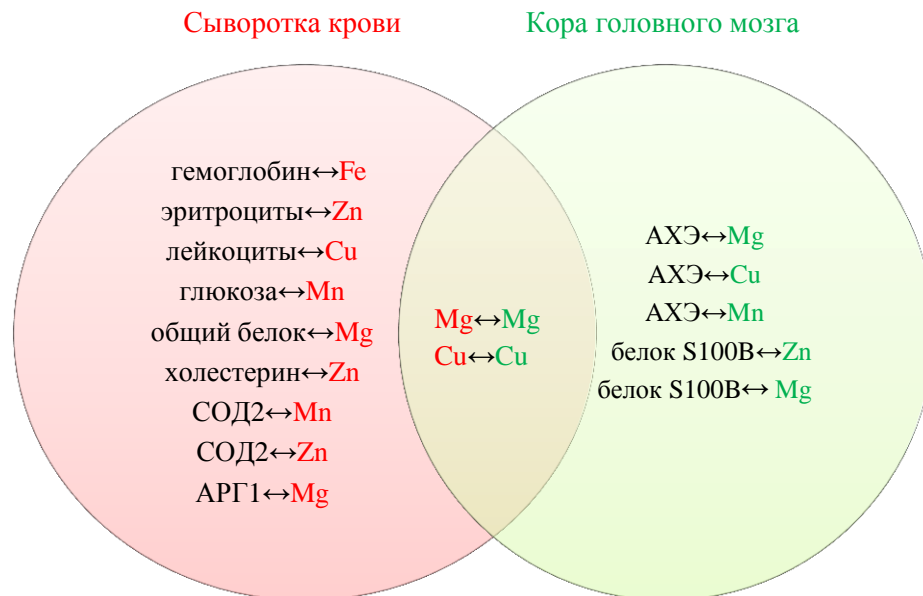


Рисунок 32 – Общие корреляционные взаимосвязи между показателями элементного статуса животных опытных групп и морфобиохимическими параметрами крови,  $r \geq 0,3$  при  $p \leq 0,05$

Примечание – Красным цветом выделены химические элементы сыворотки крови, зеленым цветом выделены химические элементы коры головного мозга.

Однако выявленные корреляции между различными химическими элементами сыворотки крови/коры головного мозга и морфобиохимическими показателями не могут быть окончательно объяснены каким-либо одним процессом, а скорее отражают сложную систему биохимических реакций и могут быть сопутствующим явлением.

## ГЛАВА 6. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

За последнее десятилетие значительно возрос интерес к исследованиям в области изучения закономерностей и механизмов адаптации организма человека и животных к воздействию Мп. Такое внимание к данной проблеме вызвано целым рядом объективных причин, среди которых главное место занимает ухудшение экологической обстановки. Исходя из современных данных, повышенные уровни Мп продолжают оставаться в водных объектах и почвах, а, следовательно, и в пищевой цепи, оказывая неблагоприятное влияние на все слои населения. Помимо этого, усугубляет данное положение и нарушение принципов оптимального питания, активное употребление биологически активных добавок, что приводит к нарушению усвоения химических элементов организмом (Скальный А.В. и др., 2011). Такие изменения условий отражаются на состоянии здоровья человека и могут проявляться функциональными расстройствами в различных физиологических системах (Сальникова Е.В. и др., 2019; Ali H. et al., 2019).

Следует отметить, что охрана здоровья детей является одним из приоритетных направлений государственной политики в сфере здравоохранения РФ (Штина И.Е. и др., 2017). В связи с этим, в последние годы все большее внимание учеными уделяется изучению последствий негативного воздействия техногенных факторов на формирование детского организма (Пухова Т.Г. и др., 2022). Важнейшей темой исследования, которая остается до сих пор недостаточно изученной, является оценка хронического стресса, обусловленного воздействием Мп в пре- и гестационные периоды, на здоровье матери и плода. Как известно, наиболее чувствительными к воздействию факторов окружающей среды являются группы населения со сниженными адаптационными возможностями, к которым, в первую очередь, относятся беременные женщины и дети. Об этом свидетельствуют высокая частота осложнений беременности и родов, врожденных дефектов развития и высокая заболеваемость детей, проживающих в экологически неблагоприятных регионах.

Несмотря на многочисленные исследования физиологических и патофизиологических эффектов воздействия Mn на взрослое население, недостаточно данных о влиянии субтоксических доз Mn на развивающийся организм, требуется более глубокое понимание рисков его воздействия. В ходе исследования была выдвинута гипотеза о том, что воздействие Mn в период внутриутробного развития может предрасполагать потомство к возникновению нарушений гомеостатических механизмов, поведенческих и когнитивных реакций на более поздних этапах постнатального развития.

При проведении исследования были соблюдены необходимые требования по точности измерения и чистоте исследования: объектом исследования были линейные животные (крысы Wistar); исследования, касающиеся изучения поведенческих реакций были реализованы с использованием апробированных методов когнитивного и поведенческого исследования, входящих в перечень установок для выполнения психофармакологических тестов согласно приказу Минздрава России № 281 от 30.04.2013; в ходе работы были использованы современные высокочувствительные аналитические методы (масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой, высокоэффективная жидкостная хроматография, иммуноферментный анализ); все анализы, включая определение валового содержания элементов, металл-лигандных форм металлов и морфобиохимических показателей крови, проводились в аттестованных лабораториях АНО «Центр биотической медицины» г. Москва (регистрационный номер лицензии Л041-01137-77/00324496), ООО «Микронутриенты» г. Москва (регистрационный номер лицензии Л041-01137-77/00370156) и Испытательного центра ЦКП БСТ РАН (заключение № 2032); обработку полученных данных осуществляли с помощью методов вариационной статистики с использованием статистического пакета «StatSoft STATISTICA 10».

На рисунке 33 представлено графическое изображение основных полученных результатов исследования.

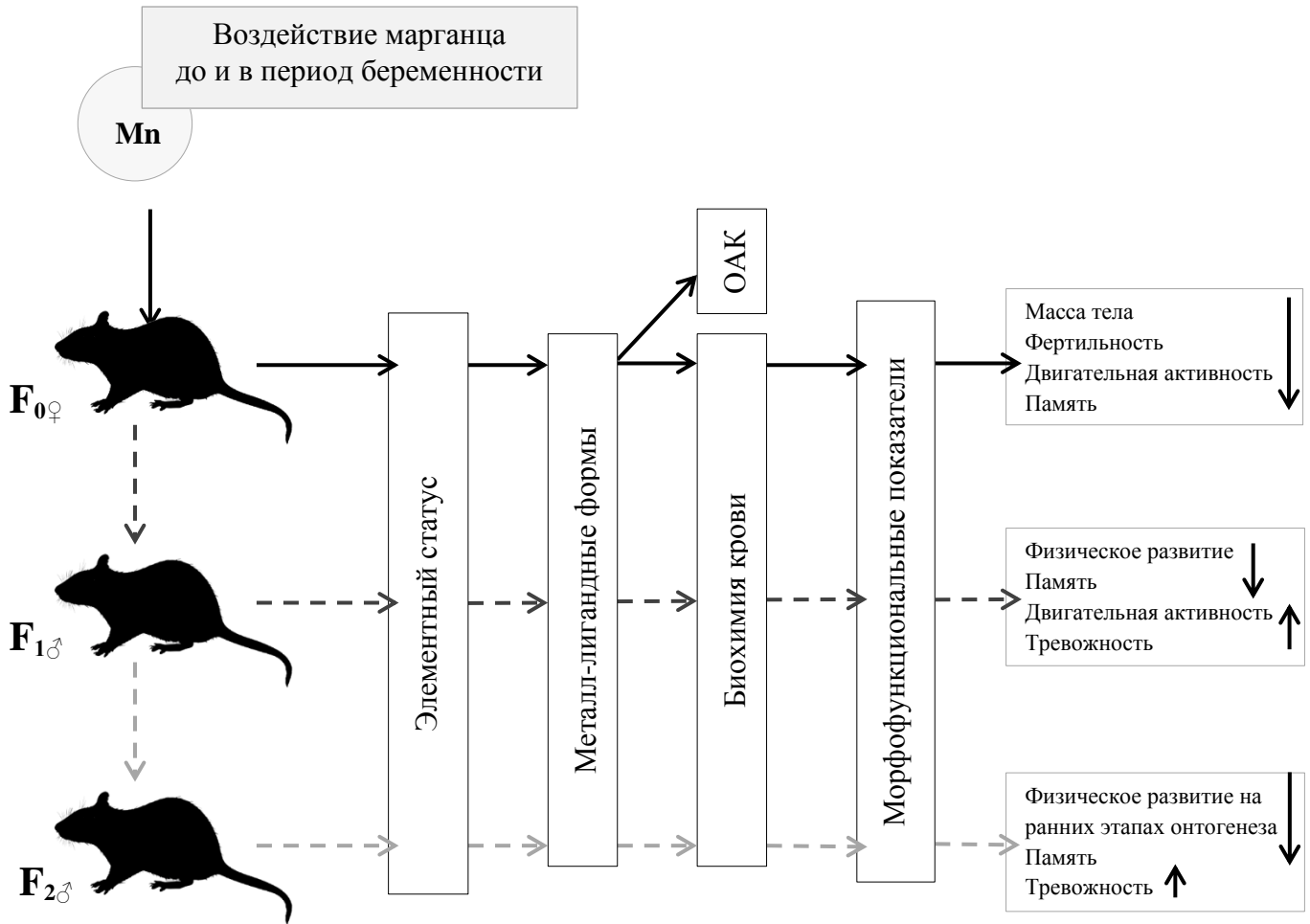


Рисунок 33 – Графическое представление основных результатов исследования

Диссертационная работа была разделена на три исследовательских этапа.

*Первый этап* включал изучение биологических эффектов пролонгированного перорального воздействия Mn на взрослый организм животных.

Планируя работу, в первую очередь, попытались смоделировать условия, при которых на организм лабораторных животных действовали бы субтоксические дозы Mn. Как известно, моделирование является мощнейшим оружием ученых, позволяющим изучить патогенетическую структуру и механизмы формирования заболеваний. Именно по результатам экспериментов на лабораторных животных сформированы представления и изучены основные патогенетические звенья развития различных нарушений. Важной особенностью методологических подходов к экспериментальному моделированию является

адекватность создаваемой модели задачам исследований, допустимость экстраполяции данных с модели на человека. С этой целью самки крыс линии Wistar ежедневно получали пентагидрат сульфата марганца в дозе 1433 мг/кг корма. Следует отметить, что выбранная доза соответствовала субтоксической величине, способной приводить к развитию поведенческих и когнитивных нарушений у грызунов, что согласовалось с рядом исследований (Beaudin S.A. et al., 2017; Conley T.E. et al., 2020; Taylor C.A. et al., 2020). Поскольку в естественных условиях воздействие Mn на организм является результатом длительного процесса, в ходе которого данный тяжёлый металл способен кумулироваться в организме, в настоящем исследовании мы использовали экспериментальную модель с хроническим воздействием Mn.

В ходе данного этапа было установлено, что хроническое пероральное воздействие Mn до и в период беременности не повлияло на внешние признаки и активность лабораторных животных. Однако у испытуемых было установлено снижение прироста живой массы по сравнению с контролем, наблюдалось увеличение массового коэффициента печени, отмечалось ухудшение репродуктивной способности, а также фиксировалось более раннее наступление родовой деятельности.

Известно, что общетоксическое действие Mn может быть сопряжено со снижением прироста массы тела (Lopotych N. et al., 2020; Beasley T.E. et al., 2022). Похожие результаты были получены в исследовании Molina R.M. et al. (2011), в ходе которого авторами была установлена более низкая масса тела самок крыс, подвергавшихся во время беременности и лактации воздействию данного металла.

Увеличение массового коэффициента печени указывает на гепатотоксическое действие Mn и развитие возможной воспалительной реакции, обусловленной выраженными кумулятивными свойствами данного металла (Zhu X. et al., 2020). Важно отметить, что нарушения в работе гепатобиллиарной системы материнского организма могут способствовать увеличению проницаемости фетоплацентарного барьера, что создает благоприятные условия

для еще более интенсивного поступления Mn в системе мать-плацента-плод. Как следствие, это ведет к формированию стрессового состояния плода, что в конечном итоге обуславливает напряжение адаптационных резервов организма. В одном из исследований было показано, что при токсической дистрофии печени матерей более чем у 50 % новорожденных детей выявлялись изменения гистологической структуры данного органа (Савченков Ю.И. и Лобынцев К.С., 1980).

В ходе экспериментальной работы было установлено, что пероральное воздействие Mn в пре- и гестационный периоды оказывает негативные последствия на показатели генеративной функции животных, снижая индекс плодовитости и беременности. Полученные результаты согласуются с работами ряда авторов, в которых также было продемонстрировано, что длительное воздействие Mn способно приводить к снижению фертильности животных (Sengupta P. et al., 2015; Souza T.L. et al., 2019).

Оценивая поведенческие параметры лабораторных животных, подвергшихся хроническому пероральному воздействию Mn, к концу четвертой недели эксперимента было обнаружено снижение двигательной активности, развитие тревожного поведения и ухудшение памяти у самок крыс. Следует отметить, что подобные данные встречаются в литературе, как в экспериментальных, так и в клинических исследованиях (Dlamini W.W. et al., 2020). Главной причиной развития таких нарушений является способность Mn преодолевать гематоэнцефалический барьер и накапливаться в различных структурах мозга, влияя на уровень нейромедиаторов, что приводит к наблюдаемым двигательным и когнитивным нарушениям (Balachandran R.C. et al., 2020).

Анализ гематологических показателей крови уже давно используется в качестве диагностического инструмента для изучения патологических, физиологических и метаболических изменений в организме. В настоящем исследовании было показано, что уровень лейкоцитов был ниже у лабораторных животных, подвергшихся пероральному воздействию Mn, по сравнению с

таковым в контрольной группе. Полученные результаты согласуются с исследованиями, в которых также сообщалось о снижении количества лейкоцитов на фоне воздействия соединений Mn (Hussein M.A. and Kata F.S., 2008). В отличие от данных, полученных в проведенном эксперименте, в некоторых работах, напротив, было показано, увеличение уровня лейкоцитов на фоне воздействия Mn (Chandel M. and Jain G., 2016). Подобное расхождение в результатах, возможно, может быть связано с различными способами введения металла, а также продолжительностью его воздействия. Полученные данные в изменении показателей белой крови свидетельствуют об инициации реакции активации, что несет основную антистрессорную функцию. В данную стадию происходит повышение резистентности организма за счет подъема активности защитных подсистем, что является биологическим смыслом данной реакции. Следует отметить, что здоровый организм способен длительное время поддерживать РПА, являясь стойкой реакцией, однако если своевременно не уменьшить дозу воздействующего фактора РПА легко переходит в стадию стресса или переактивации, что является неспецифической основой предпатологии и патологии (Гаркави Л.Х. и др., 1990). Также в полученных результатах исследования было отмечено снижение уровня тромбоцитов после воздействия Mn, что может быть связано с нарушением процесса кроветворения. Аналогичные изменения были зарегистрированы на фоне воздействия сульфата марганца в исследовании индийских ученых (Sharma J. and Langer S., 2014).

Полученные данные биохимического анализа крови позволили предположить о нарушениях в углеводном и липидном обменах животных на фоне перорального воздействия Mn. С одной стороны, известно, что Mn, как эссенциальный элемент, выполняет многочисленные функции в организме, оказывая особо выраженное действие на инсулиновый обмен – усиливает гипогликемический эффект инсулина и повышает гликолитическую активность, имеет решающее значение в процессе глюконеогенеза (Szentmihályi K. et al., 2022). Также Mn обладает липотропными свойствами, повышая интенсивность утилизации жиров и снижая уровень липидов (Luo X. et al., 2020). Однако в ряде

исследований было показано, что высокие дозы Mn способствуют нарушению углеводного и липидного обменов. Так в работе иранских ученых было выявлено, что после введения субтоксических доз Mn у крыс значительно повышались уровни глюкозы и холестерина (Mousavi Z. et al., 2016). Выявленные биохимические изменения можно объяснить окислительным стрессом, возникающим на фоне избыточного поступления Mn в организм животных. Такое воздействие может способствовать нарушению нормального функционирования митохондрий за счет увеличения образования в них активных форм кислорода (АФК), что приведет к ингибированию синтеза АТФ и изменению проницаемости мембран. Подобные нарушения приводят к еще большему образованию АФК и усиливают окислительный стресс в митохондриях, что служит триггером для развития метаболических нарушений (Wang H. et al., 2017; Li L. and Yang X., 2018).

В ходе проведенного исследования впервые были установлены изменения уровня марганецсодержащих ферментов (АРГ1 и СОД2) и нейроспецифических показателей (S100B) на фоне перорального воздействия Mn.

Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что повышение уровня АРГ1 в сыворотке крови, возможно, было вполне закономерно и являлось компенсаторно-приспособительным механизмом с целью поддержания постоянства внутренней среды. Известно, что Mn химически достаточно активен, поэтому в организме он стабилизируется в комплексе с различными белками (Michalke B. et al., 2015). Таким образом, гомеостаз в определенных пределах способен перестраивается на новый уровень, более адекватный для конкретных условий, что служит основой адаптации. Следует отметить, что орнитинный цикл чувствителен к изменениям уровня Mn. В исследовании, проведенном американскими учеными, было показано, что у животных, получавших Mn-дефицитную диету, происходило снижение содержания Mn в печени и активности аргиназы (Brock A.A. et al., 1994; Ensunsa J.L. et al., 2004). Интересно отметить, что в исследованиях китайских ученых сообщалось об увеличении синтеза АРГ1 под действием различных стимуляторов, включая активные формы



кислорода (АФК). Учеными был сделан вывод, что сывороточная АРГ1 ассоциирована с окислительным стрессом и может стать новым биомаркером для раннего прогнозирования заболеваний, связанных с ним (Ogino K. et al., 2011). Поэтому, можно также предположить, что на фоне поступления высокого уровня Мп происходит генерация АФК, окислительный стресс и воспаление, вызывающие увеличение уровня данного фермента в крови. Помимо вышеперечисленного, изменение уровней ферментов в крови является индикатором повреждения тканей за счет их системного высвобождения из различных клеток в кровотоке. Сообщается, что АРГ1 высоко экспрессируется в клетках печени, поэтому может быть использована в качестве специфического маркера повреждения данного органа. В одном из исследований у лабораторных животных измеряли уровень сывороточной АРГ1, АСТ и АЛТ при остром и хроническом гистопатологическом повреждении печени. Изменение уровня АРГ1 показало самое раннее и наибольшее повышение среди исследованных ферментов. Возможно, что повышенный уровень сывороточной аргиназы является индикатором некроза печени для обнаружения незначительных повреждений (некроза единичных клеток) (Tarrant J., 2017). Считается, что такое увеличение приводит к расщеплению аргинина, нарушая его доступность, тем самым приводя к нарушениям микроциркуляции и подавлению иммунитета (van de Poll M.C. et al., 2008). Однако стоит обратить внимание, что основной проблемой является множественное происхождение циркулирующей аргиназы в крови, которая может возникнуть в результате системного высвобождения фермента из различных клеток, включая не только гепатоциты, но и эритроциты, миелоидные клетки, энтероциты. Поэтому клиническая значимость и биологический интерес измерения циркулирующей АРГ1 при воздействии на организм Мп довольно спорная. Интересно добавить, что вызванные изменения уровня АРГ1 могут привести к дисбалансу в продукции L-орнитина и его нижестоящих метаболитов, что в дальнейшем может быть связано с различными патологическими процессами, включая и нейродегенеративные расстройства (Polis B. et al., 2020). В частности, повышение уровня АРГ1 было связано с такими

заболеваниями, как болезнь Альцгеймера, Паркинсона и рассеянный склероз. В исследовании израильских ученых было установлено накопление аргиназы в местах отложения  $\beta$ -амилоида, что было связано со снижением уровня L-аргинина и нейродегенеративными процессами (Polis V. et al., 2018). Также было показано, что экспрессия и активность АРГ1 повышалась в образцах головного и спинного мозга на крысиной модели рассеянного склероза (Ljubisavljevic S. et al., 2012).

По результатам исследования при пероральном воздействии Mn в сыворотке крови повышался уровень СОД2. Во многих исследованиях была доказана взаимосвязь между воздействием Mn и окислительным стрессом (Ismail Н.Т.Н. 2019). Таким образом, увеличение содержания СОД2 может свидетельствовать об адаптивном ответе организма на состояние окислительного стресса, на фоне которого идет реактивная мобилизация антиоксидантных резервов. Как упоминалось ранее, Mn выступает в качестве сильного комплексообразователя, в связи с чем повышение уровней марганецсодержащих ферментов также могло носить компенсаторный характер, направленный на снижение содержания свободных химически активных форм Mn.

Интересным, на наш взгляд, является выявленное повышение уровня белка S100B в сыворотке крови на фоне пролонгированного перорального воздействия Mn. Как показано рядом работ, S100B представляет собой низкомолекулярный кальций-связывающий белок, высокоспецифичный для нервной ткани (Hagmeier S. et al., 2018; Michetti F. et al., 2019). Он обнаружен в цитозоле глиальных клеток центральной и периферической нервной системы, а также в меланоцитах, адипоцитах и хондроцитах (Arrais A.C. et al., 2022). Установлено, что в зависимости от содержания, данный белок проявляет двойное действие, оказывая трофический эффект при низких уровнях (рост нейритов, выживаемость нейронов) и токсический при высоких (стимулирует экспрессию воспалительных цитокинов и индуцирует апоптоз) (Langeh U. and Singh S., 2021). Благодаря низкой молекулярной массе S100B может проникать в кровь при повышении проницаемости гематоэнцефалического барьера (Murcko R. et al., 2022). В связи с этим, содержание белка S100B в сыворотке крови используют в качестве маркера

различных неврологических расстройств. Таким образом, увеличение концентрации сывороточного белка S100B в проведенном исследовании у взрослых животных, подвергшихся пероральному воздействию Mn, позволяет использовать его в качестве возможного прогностического критерия нейротоксического действия Mn.

Существует предположение, что именно отклонения в балансе химических элементов могут служить основой возникновения функциональных изменений в различных физиологических системах. Как известно, макро- и микроэлементы являются активными участниками сложных и многообразных биохимических процессов. В ходе исследования было установлено нарушение гомеостаза целого ряда элементов на фоне пролонгированного перорального воздействия Mn.

Выявленное в ходе анализа снижение сывороточных уровней Ca, Mg, Fe и Cu обусловлено избыточным поступлением в организм животных функционального конкурента/антагониста этих металлов – Mn. Всасывание данных элементов в желудочно-кишечном тракте осуществляется общими транспортными системами, и соответственно, пищевой статус Mn способен влиять на кинетику представленных химических элементов. Известно, что как Mn, так и Fe могут транспортироваться с помощью трансферринового цикла, ферропортина, а также транспортера двухвалентного металла 1 (DMT1) (Gunter T.E. et al., 2013). Помимо этого, данный транспортер также может переносить Cu и Zn (Mercadante C.J. et al., 2016). Полученные результаты согласуются с данными многих авторов. В ряде исследований было зафиксировано, что дефицит Fe усиливает накопление Mn, в то время как избыток Mn может аналогичным образом изменять гомеостаз Fe (Smith E.A. et al., 2013). В работе Smyth L.T. (1973) и соавторов было установлено, что пероральное воздействие хлорида марганца в течение одного месяца снижало содержание Fe в плазме. Следует отметить, что полученные результаты согласуются с данными Scheuhammer A.M. и Cherian M.G. (1983). Таким образом, можно предположить, что избыточное поступление Mn в организм приводит к нарушению уровней Ca, Fe и Cu в сыворотке крови, что в свою очередь запускает каскад изменений в

содержании других элементов. Нарушение гомеостаза химических элементов может оказать негативное влияние на процессы дифференцировки, пролиферации и функционирование клеток крови, что согласуется с рядом исследований (Потемина Т.Е. и др., 2020; Chen Y.H. et al., 2017; Oliveira D.C. et al., 2018). Следует отметить, что дефицит представленных элементов во время беременности может неблагоприятно повлиять на функциональное состояние потомства, став причиной развития системных нарушений в организме новорожденного, снижения иммунного статуса, нарушения роста и гемопоза (Gernand A.D. et al., 2016).

Обращает на себя внимание выявленная четкая тенденция к повышению содержания в сыворотке крови I и Se у животных, подвергшихся пероральному воздействию Mn. Повышение уровня I, возможно, обусловлено блокирующим действием ионов Mn на поглощение щитовидной железой данного микроэлемента, что согласуется с исследованиями французских ученых Buthieau A.M. и Autissier N. (1977). Хорошо известно, что соединения Se оказывают антитоксическое действие при отравлении солями многих тяжелых металлов. Селенопротеины крови имеют большое сродство к тяжелым металлам, благодаря чему способны образовывать металлические комплексы и транспортировать их (Zwolak I., 2020). В исследовании китайских ученых было установлено, что воздействие ртути может влиять на гомеостаз Se и распределение селенопротеинов в сыворотке крови дозозависимым образом (Tinggi U. and Perkins A.V., 2022). Это обуславливает выявленную в работе тенденцию к повышению уровня Se в крови животных.

Как известно, содержание химических элементов в различных структурах центральной нервной системы зависит от интенсивности их функциональной деятельности. Наиболее высокие концентрации большинства элементов регистрируются в коре больших полушарий (Авцын А.П. и др., 1991). При исследовании содержания химических элементов в коре головного мозга было установлено, что наибольшие изменения произошли также у самок крыс, подвергшихся пероральному воздействию Mn. Данные изменения

сопровождались достоверным накоплением Mn, Pb, Hg и Sr на фоне снижения содержания Fe и I. Следует отметить, что в коре головного мозга увеличивалось непосредственно накопление тяжелых металлов, что, возможно, связано с нарушением проницаемости гематоэнцефалического барьера. Вполне вероятно, что Mn-индуцированный окислительный стресс вызывает повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера, приводящее к увеличению притока тяжелых металлов (Блинов Д.В. 2013, 2014; Sharma A. et al., 2021). Сообщается, что повышение содержания уровней химических элементов происходит в областях мозга с высокой интенсивностью биохимических процессов и окислительной активностью (Осипова Е.В., 2005). С химической точки зрения, Mn и Fe расположены рядом друг с другом в периодической таблице, что позволяет им конкурировать за связывание с транспортными белками (Хомченко Г.П. и Цитович И.К., 1987; Liu Q. et al., 2021). Полученные результаты наглядно продемонстрировали, что хроническое воздействие Mn изменяет гомеостаз Fe в системном кровообращении, снижая его содержание в сыворотке крови, а также и в головном мозге, что согласуется с рядом исследований (Li G.J. et al., 2006; Wang X. et al., 2008). Как правило, в железодефицитных областях головного мозга происходит усиленное накопление Mn, приводящее к активации окислительного стресса (Erikson K.M. et al., 2002; Peres T.V. et al., 2016).

Из полученных данных можно заключить, что длительное потребление субтоксической дозы Mn с пищей критически влияет на распределение металлов как в сыворотке крови, так и в головном мозге. Следует подчеркнуть, что дисбаланс химических элементов в организме непосредственно влияет на функционирование практически всех систем и органов, вызывая значительное напряжение адаптационных механизмов, и в ряде случаев может привести к возникновению патологических состояний (Авцын А.П. и др., 1991). Важно отметить, что уровень обеспеченности организма до и во время беременности химическими элементами может оказать непосредственное влияние на систему «мать-плод-новорожденный».

Особый интерес представляют данные, полученные при изучении металл-лигандных фракций Mn путем проведения анализа химических форм металлов «Speciation-анализ». Данный метод исследования представляет собой разновидность химического анализа, суть которого состоит в определении качественного и количественного содержания различных форм химического элемента, присутствующего в испытуемом образце (Айсывакова О.П., 2018). Следует отметить, что состав и структура конкретных форм определяют свойства металлов. В связи с этим, определение органических и неорганических фракций Mn важны с многих точек зрения, а именно, его биодоступности, биологической активности и токсичности. Ещё в 2000 году итальянские ученые упомянули о значимости измерения различных видов Mn в качестве важного инструмента для понимания его токсичности (Apostoli P. et al., 2000). Следует отметить, что исследования по изучению металл-лигандных форм Mn в организме млекопитающих *in vivo* проводятся довольно редко, в литературе практически не встречается подобных исследований. В основном встречаются данные, связанные с экологическими аспектами, например, изучение химических форм Mn в почве и пыли, растениях, рыбе (Grygo-Szymanko E. et al., 2016; Blamey F.P.C. et al., 2018). В связи с этим, одной из основных задач данной работы было определение химических форм Mn в сыворотке крови животных до и после воздействия данного металла. В ходе анализа в сыворотке крови самок крыс линии Wistar было идентифицировано четыре марганецсодержащих фракции, а именно, Mn-A2M, Mn-Tf/Alb, Mn-LMM и Mn-free. Было установлено, что пролонгированное пероральное воздействие Mn способствовало повышению валового содержания данного металла в крови, инициируя при этом перераспределение Mn по его металл-лигандным формам. Главным образом, в сыворотке крови статистически значимо увеличилось содержание Mn-LMM (в 4 раза), а также фракции Mn-Tf/Alb (в 1,9 раза) и Mn-free (в 1,8 раза). Полученные результаты наглядно демонстрируют, что длительное воздействие субтоксических доз Mn может привести к смещению его металл-лигандных форм в сторону низкомолекулярных соединений LMM, а также неорганической фракции, что может быть связано с

перегрузкой других транспортных молекул. Образование низкомолекулярных носителей (Mn-LMM) в организме на фоне повышенного воздействия данного металла обсуждается уже несколько лет (Michalke B. et al., 2013; 2015; Neth K. et al., 2015). Было сделано предположение, что именно низкомолекулярные фракции Mn способны преодолевать гематоэнцефалический барьер и накапливаться в тканях головного мозга, вызывая нейротоксический эффект.

Применение методов металломики позволило провести более глубокие наблюдения за взаимосвязями металлов и их форм на фоне повышенного, но нетоксичного воздействия Mn. Проведенный корреляционный анализ продемонстрировал, что увеличение содержания Mn-LMM форм в крови сопровождалось достоверным повышением общего уровня Mn в головном мозге. Полученные результаты подтверждаются перфузионным исследованием Yokel R.A. и Crossgrove J.S. (2004), в ходе которого авторы обнаружили более высокий коэффициент притока из крови в мозг Mn-LMM по сравнению с Mn-free и Mn-Tf комплексами. В исследованиях, проведенных немецкими учеными, было показано, что у крыс Sprague Dawley через час после однократной внутривенной инъекции нетоксичной дозы хлорида марганца происходила «перегрузка» марганцевого носителями (Mn-Tf) и отмечалось активное образование Mn-LMM, при этом через четыре дня в головном мозге были обнаружены значительно повышенные уровни Mn (Diederich J. et al., 2012). Полученные результаты указывают на то, что Mn-LMM проникают через гематоэнцефалический барьер более активно и накапливаются в головном мозге. Таким образом, исходя из вышеперечисленного, определение уровня Mn-LMM в сыворотке крови может служить в качестве биомаркеров воздействия Mn.

Важно отметить, что, несмотря на наличие многочисленных работ в области изучения токсических эффектов Mn на организм, до сих пор недостаточно данных о пренатальных последствиях воздействия данного металла с использованием лонгитюдных подходов исследования. В связи с этим, одним из интересных направлений является оценка долгосрочных последствий воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды на развивающийся организм.

*Второй этап* исследований включал изучение последствий пренатального воздействия Mn на организм потомства.

В ходе проведенного эксперимента было обнаружено, что животные, развивавшиеся в условиях пренатального воздействия Mn, по многим показателям уступали контрольным. Вес и размер опытных животных первого поколения при рождении был достоверно ниже, чем в группе контроля. Отмечалось отставание в физическом развитии, что характеризовалось более поздними сроками открытия глаз, формирования шерстяного покрова и прорезывания резцов. Следует отметить, что достоверные различия в массе сохранялись и в старшем возрасте животных. Интересно отметить, что у данной группы животных отмечался достоверно более высокий МК печени. Полученные данные согласуются как с более ранними работами, проведенными Dorman D.C. et al. (2000) и Garcia S.J. et al. (2006, 2007), так и с более поздними исследованиями Vorhees C.V. et al. (2014) и Amos-Kroohs R.M. et al. (2017), в которых сообщалось о снижении массы тела у подвергнувшегося воздействию Mn потомства. Одним из возможных объяснений подобного эффекта может быть окислительный стресс, возникающий на фоне избыточного поступления Mn, следствием которого является нарушение клеточных функций и роста (Pizzino G. et al. 2017). Однако, наравне с этим, существуют и противоположные данные. В литературе представлены работы, в которых было установлено увеличение веса животных на фоне пренатального воздействия Mn, либо вовсе отсутствовали отличия от контрольных значений (Tran T.T. et al., 2002; Molina R.M. et al., 2011). Подобное несоответствие в полученных результатах может быть обосновано выбором разных доз воздействия данного химического элемента на организм. Так в клинических исследованиях ряда ученых была выявлена инвертированная U-образная зависимость между уровнями Mn в крови материей во время беременности и массой тела младенцев. Было показано, что как дефицитное, так и профицитное содержание Mn в материнской крови связано с более низким весом новорожденных (Eum J.H. et al., 2014; Ashley-Martin J. et al; 2018; Yamamoto M., 2019). Хотелось бы подчеркнуть, что сравнение исследований, посвящённых



изучению воздействия Mn, затруднено в связи с отсутствием согласованности в методиках проведения экспериментов. Тем не менее, в настоящее время проблема новорожденных детей с низкой и экстремально низкой массой тела является одной из ключевых в неонатологии и педиатрии. В многочисленных научных исследованиях подтверждается, что функционирование центральной нервной системы ребенка и показатели детской заболеваемости имеют прямую корреляционную связь со степенью отставания метрических параметров (Стрижаков А.Н. и др., 2019). Сообщается, что низкая масса тела новорожденных связана с неблагоприятными исходами развития нервной системы (Заваденко Н.Н. и Давыдова Л.А., 2018).

Полученные результаты поведенческого и когнитивного исследования показали, что воздействие Mn в период пренатального онтогенеза приводит к отсроченным отклонениям в поведенческих реакциях, нарушениям обучения и памяти животных.

Тест «Открытое поле» в данном исследовании использовался для оценки локомоторной активности и тревожности животных. Результаты тестирования показали, что пренатальное воздействие Mn способствует развитию гиперактивного поведения у крыс на более поздних этапах постнатального онтогенеза (84-ый день постнатального развития, период зрелости), что может указывать на последствия интоксикации данным тяжелым металлом в период внутриутробного развития. Рядом ученых было показано, что Mn нарушает баланс нескольких нейромедиаторных систем (дофамин- и холинергическая), особенно в развивающемся мозге, и вызывает широкий спектр поведенческих нарушений, включая изменение сенсомоторной функции и когнитивных способностей (Schetinger M.R.C., 2019). Полученные данные согласуются с исследованиями Chandra S.V. и соавторов (1979), Rappas B.A. и соавторов (1997), Brennehan K.A. и соавторов (1999), в которых было установлено, что воздействие Mn в пренатальный период и период грудного вскармливания приводило к гиперактивности животных на 21-ый, 60-ый и 90-ый день постнатального развития. Однако, как отметили ученые, на 120-ый день постнатального развития

и позднее никаких различий от контроля в поведении животных не наблюдалось. Тем не менее, в литературе представлены довольно противоречивые данные: в исследовании Dorman D.C. (2000) не отмечалось отклонений в двигательной активности животных, подвергшихся воздействию Mn, а в работе Betharia S. и Maher T.J. (2012), напротив, наблюдалась гипоактивность и повышенная тревожность на 24-ый и 59-ый день развития. Независимо от этого, в целом результаты исследований указывают на нейротоксический эффект Mn.

Результаты теста «Водный лабиринт Морриса» показали, что пренатальное воздействие Mn может оказать негативные последствия на состояние когнитивных способностей организма на более поздних этапах постнатального развития, а именно, привести к ухудшению пространственного обучения и памяти, что говорит о снижении эффективности адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды. Результаты тестирования показали, что взрослым животным, развивавшимся в условиях внутриутробного воздействия Mn, требовалось больше времени, чтобы найти скрытую платформу, паттерны движения были хаотичными в целевом квадранте при оценке пространственной памяти, что свидетельствует о нарушении процессов обучения и запоминания. Возможно, подобные отклонения возникли за счет накопления данного нейротропного металлоэлемента в структурах головного мозга животных, связанных с обучением, памятью и вниманием (кора головного мозга, базальные ганглии, гиппокамп), что, как следствие, и оказало неблагоприятный эффект на формирование пространственного навыка. Полученные результаты носят довольно дискуссионный характер и могут стать основой для дальнейших исследований. В эксперименте, проведенном Pappas В.А. и соавторами (1997), у лабораторных крыс, подвергшихся в период пренатального развития и грудного вскармливания воздействию Mn, напротив не было выявлено когнитивных нарушений на 25-ый и 95-ый день постнатального развития. Однако следует отметить, что используемые дозы воздействия Mn в данной работе были ниже, чем в нашем исследовании. Наравне с этим, в работе, проведенной американскими учеными, у животных, подвергшихся в аналогичные периоды

развития воздействию Mn, на 25-ый и 60-ый день развития было выявлено расстройство памяти (Betharia S. and Maher T.J., 2012). Похожие результаты были установлены в работах других зарубежных ученых (Zhang D. et al., 2002; Kern С.Н., 2010). Противоречивость полученных данных как в тесте «Открытое поле», так и в тесте «Водный лабиринт Морриса» возможно, связана с тем, что последствия воздействия Mn во многом зависят от ряда сопутствующих факторов, включая дозу воздействия, продолжительность экспозиции, способ поступления металла в организм, возраст и пол экспериментальных животных, а также индивидуальная чувствительность и метаболическая детоксикационная способность организма. Следует отметить, что во многих исследованиях, как правило, изучались последствия пренатального воздействия Mn на ранних этапах постнатального развития животных, не беря во внимания более поздние этапы онтогенеза.

Результаты проведенного исследования также свидетельствуют о том, что обнаруженные отклонения в поведении потомства, чьи матери до и в период беременности подвергались воздействию Mn, очевидно, обусловлены не структурными повреждениями головного мозга, а скорее связаны с нейрохимическими нарушениями, вызванными данным металлом. Это утверждение подтверждается полученными результатами иммуноферментного и элементного анализа.

Высокая представленность холинергических нейронов в структурах головного мозга, играющих ключевую роль в формировании когнитивных функций, обуславливает критическую важность холинергической передачи для памяти, обучения и внимания (Дзяк Л.А. и Цуркаленко Е.С., 2019). В связи с чем, была проведена оценка содержания в сыворотке крови одного из важнейших ферментов холинергической системы – ацетилхолинэстеразы. Как известно, данный фермент (КФ 3.1.1.7) принадлежит к семейству эстераз, участвует в прекращении передачи нервного импульса за счет гидролиза нейромедиатора ацетилхолина в многочисленных холинергических путях в центральной и периферической нервной системе (Tomlinson G. et al., 1981; Cheung J. et al., 2012).

Учеными установлено, что АХЭ чувствительна к факторам окружающей среды и является потенциальным маркером для оценки воздействия токсикантов (Dutta S. and Bahadur M., 2019). В некоторых странах определение активности данного фермента в крови пациентов, подвергавшихся воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды (пестициды, тяжёлые металлы) является обязательным при медицинском обследовании (Lionetto M.G. et al., 2013). Следует отметить, что Nan S.H. с соавторами (2019) в своем исследовании показали, что помимо активности, можно также использовать оценку содержания данного фермента в качестве потенциального биомаркера для прогнозирования развития расстройств нервной системы. В исследованиях американских ученых была подтверждена также значимость количественного определения АХЭ в амниотической жидкости как надежного диагностического теста на дефекты нервной трубки (Rasmussen Loft A.G. et al., 1990). В ходе проведенного анализа было установлено, что уровень АХЭ у взрослого потомства опытной группы превышал статистически значимо контрольные значения на 47 %. В связи с тем, что чаще оцениваются уровни ферментативной активности АХЭ и гораздо реже определяется количественное содержание данного фермента, в литературе недостаточно информации о пуле АХЭ в различных биосубстратах при патологических и нормальных физиологических состояниях. Рядом учёных было выявлено ингибирование активности АХЭ после воздействия как острых, так и хронических доз Mn в различных биосубстратах (мозг, кровь, спинномозговая жидкость) взрослых и новорожденных крыс, однако данных об изменении уровней самого белка при подобных условиях в доступной литературе не представлено (Santos D. et al., 2012; Okada M.A. et al., 2016). Тем не менее, в экспериментальной работе польских ученых было показано, что у взрослых крыс, получавших в течение двух месяцев рацион с добавлением повышенного содержания Cu, увеличивалось содержание АХЭ в крови и головном мозге (Cendrowska-Pinkosz M. et al., 2021). Как упоминалось ранее, воздействие Mn увеличивает риск развития нейрогенеративных заболеваний. Интересно отметить, что в клинических и посмертных исследованиях в образцах крови пациентов с

болезнью Альцгеймера и головном мозге, несмотря на снижение ферментативной активности АХЭ, были установлены повышенные уровни данного белка на фоне увеличения проницаемости гематоэнцефалического барьера (García-Ayllón M.S. et al., 2010; Campanari M.L. et al., 2016). Точный механизм изменения уровня АХЭ в крови остается неясным. Однако в нашем исследовании можно предположить, что повышенный уровень Мп в головном мозге крыс действует как химический стрессор для холинергических нейронов, инициирующий образование активных свободнорадикальных форм кислорода и, как результат, приводящий к развитию состояния оксидативного стресса, являющегося одним из пусковых механизмов в нарушении функционального состояния органов и систем-мишеней (Erikson K.M. and Aschner M., 2019). Это может нарушить функционирование целого ряда синаптических белков, включая фермент АХЭ, а также повлиять на проницаемость ГЭБ (Pizzino G. et al., 2017). Снижение активности АХЭ, в свою очередь, способствует чрезмерному накоплению нейромедиатора ацетилхолина в нервных синапсах периферической и центральной нервных систем, гиперстимуляции никотиновых и мускариновых рецепторов, и как следствие, нарушению передачи нервного импульса (Chtourou Y. et al., 2012). Известно, что уровень синтеза АХЭ и, соответственно, её количество контролируется паттерном активности синапса. Следовательно, усиление частоты их стимуляции увеличивает синтез данного фермента АХЭ (Rotundo R.L. et al., 2008). Сывороточная АХЭ, вероятно, имеет множественное клеточное происхождение, включая и клетки головного мозга. Изменение проницаемости ГЭБ, как при физиологическом старении, так и в ходе развития патологических состояний ЦНС может способствовать перемещению АХЭ через ГЭБ. Полученные данные указывают на то, что даже незначительное изменения в работе холинергической системы действует как «пусковой механизм» для формирования неврологических патологий. Следует отметить, что нарушение процессов барьерогенеза при развитии ЦНС может оказать существенный эффект не только в раннем постнатальном периоде, но и в отдаленные сроки индивидуального развития. В одном из исследований было показано, что если данный процесс запускается в

раннем онтогенезе, то он сохраняется на протяжении всей взрослой жизни организма с тенденцией к прогрессированию и глобализации возникающих нарушений, несмотря даже на отсутствие воздействующего фактора (Balasz M. et al., 2015).

Особого внимания заслуживает исследование обмена макро- и микроэлементов у потомства, материнский организм которых подвергался до и в период беременности воздействию Mn, так как в данном случае постнатальное развитие организма происходит в условиях отмены фактора воздействия. В доступной литературе исследования подобного рода практически отсутствуют, что определяет актуальность изучения содержания макро- и микроэлементов в различных биосубстратах потомства на более поздних этапах постнатального развития.

В ходе оценки элементного статуса было выявлено, что в коре головного мозга половозрелого потомства, подвергшегося пренатальному воздействию Mn, уровень данного металла достоверно превышал контроль на 53 %. Установленный факт подтверждает способность Mn проникать через плаценту и гематоэнцефалический барьер. Предполагается, что как незрелость гематоэнцефалического барьера, так и повышенная потребность организма в Mn во время внутриутробного развития способствуют поступлению и накоплению высоких концентраций данного химического элемента в мозге развивающегося плода. В исследованиях Pappas В.А. и соавторов (1997), а также Molina R.M. и соавторов (2011) сообщалось о повышенных концентрациях Mn в головном мозге у новорожденных крыс, а также на ранних этапах их постнатального онтогенеза, чьи матери в период беременности потребляли питьевую воду с высоким содержанием Mn. В исследованиях Garcia S.J. и соавторов (2006, 2007) также было зарегистрировано накопление Mn в различных структурах головного мозга потомства, чьи матери в период беременности и лактации потребляли рацион с повышенным содержанием Mn. Однако следует отметить, что в проведенных исследованиях, как правило, содержание Mn в мозге определялось на ранних этапах постнатального развития потомства. Тем не менее, полученные результаты

исследования показывают, что рацион с субтоксическим содержанием Mn, который получали самки крыс в период всей беременности, приводит к увеличению содержания Mn в коре головного мозга потомства. Следует отметить, что наряду с этим, уровень сывороточного Mn у половозрелого потомства опытной группы был незначительно выше контрольных значений (на 11 %), что обосновывается работой гепатобилиарной системы, которая в ходе онтогенеза полностью формируется и регулирует концентрации Mn (Gurol K.C. et al., 2022). Следует отметить, что в коре головного мозга животных опытной группы первого поколения также были выявлены достоверные отклонения в содержании Mg, Fe, Se и Co, уровни которых были ниже контрольных значений. Подобные изменения связаны с тем, что химические элементы оказывают выраженное взаимное влияние друг на друга, связанное с их взаимодействием не только на уровне абсорбции в желудочно-кишечном тракте, но и транспорта, участия в различных метаболических реакциях. В связи с этим изменение уровня одного элемента оказывает воздействие на баланс ряда других. Важно отметить, как кора головного мозга отвечает за психическую деятельность, регулируя восприятие, память, мышление и интеллект. В связи с этим, выявленные изменения в уровнях химических элементов в коре головного мозга половозрелого потомства на фоне пренатального воздействия Mn имеют колоссальное значение, так как макро- и микроэлементы являются важными компонентами нервной ткани, играющими ключевую роль в сложных биохимических процессах и обеспечивающих химическую основу деятельности центральной нервной системы. Известно, что ионы  $Mg^{2+}$  активируют  $Na^+/K^+$ -АТФазу, которая участвует в регуляции распределения катионов  $K^+$  и  $Na^+$  между клеткой и межклеточным пространством и определяют биоэлектрические свойства нервных клеток (Оберлис Д. и др., 2018). В связи с этим, дефицит Mg может привести к увеличению возбудимости нейронов, что в последующем может повлечь за собой неврологические расстройства, включая нарушение памяти, что, в частности, и наблюдалось в нашем исследовании (Xue W. et al., 2019). На фоне этого, Fe играет немаловажную роль в поддержании метаболических и энергетических потребностей нервной

ткани, процессов нейрогенеза, миелинизации аксонов, синтеза нейромедиаторов (Ward R.J. and Crichton R.R., 2019). Ряд авторов отмечает, что снижение уровня Fe зачастую связано с задержкой в развитии детей (Kim J. and Wessling-Resnick M., 2014). Se играет также многогранную роль в поддержании нормального функционирования нервной системы, предотвращая, в том числе развитие возрастных нейродегенеративных расстройств (Dominiak A. et al., 2016). Поэтому учеными не раз сообщалось, что снижение уровня Se связано с повреждением клеток головного мозга, снижением синаптической пластичности и, как следствие, развитием когнитивных нарушений (Babür E. et al., 2019). Таким образом, анализ полученных результатов дает основание говорить о том, что хроническое воздействие Mn до и в период беременности отразилось на содержании химических элементов, как в сыворотке крови, так и в коре головного мозга половозрелого потомства.

Актуальной задачей, согласно данным Европейской хартии «Окружающая среда и охрана здоровья», является прогнозирование отдаленных последствий антропогенного воздействия. Следует отметить, что в доступной отечественной и зарубежной литературе имеются единичные данные о пренатальном влиянии Mn на физиологическое состояние потомства в одном поколении. Однако, наравне с этим, вовсе отсутствует информация о возможных последствиях подобного воздействия на потомков второго поколения. Учитывая наличие в ряде регионов РФ избыточного содержания Mn, интерес представляет изучение влияния нарастающего воздействия данного металла в период беременности на становление и функционирование не только ближайшего, но и отдаленного поколения потомства.

В ходе исследования у животных второго поколения было выявлено наименьшее количество отклонений в изучаемых показателях при сравнении с контролем. Однако у животных данной группы отмечалась более низкая масса тела на ранних этапах постнатального развития, что, возможно, является отдаленным последствием воздействия Mn. На фоне этого, несмотря на отсутствие прямого фактора действия, в более позднем постнатальном онтогенезе



у данной группы фиксировались изменения в двигательном и исследовательском компоненте поведения, отмечалось нарушение пространственной памяти. Следует обратить внимание, что у потомков второго поколения наблюдалось более выраженное изменение пространственной памяти, по сравнению с контрольными животными и первым поколением. Все это сопровождалось достоверным увеличением содержания в сыворотке крови нейроспецифического белка S100B в сочетании с изменением уровня Zn и Fe. Как было ранее указано, данный белок участвует в регуляции большинства клеточных процессов, которые связаны с обеспечением механизмов восприятия и интеграции, поступающей в нервную систему информации, благодаря чему этот показатель информативен для оценки состояния центральной нервной системы. Известно, что Fe и Zn относятся к группе жизненно необходимых микроэлементов, играющих важнейшую роль в физиологических функциях (Чегус Л.А. и др., 2018). Нарушение гомеостаза данных металлов может оказать неблагоприятное воздействие на ряд биологических процессов организма, и даже стать причиной развития неврологических заболеваний (Mezzaroba L. et al., 2019).

Учитывая ряд выявленных отклонений у животных второго поколения, допустимо предполагать, что воздействие Mn в течение физиологической беременности способствует изменению генной экспрессии плода. Возникает предположение, что воздействие субтоксичных доз Mn в периоды критического развития органов и функциональных систем плода нарушает свойственные раннему онтогенезу закономерности формирования регуляторных механизмов на клеточном, тканевом и системном уровнях, что изменяет характер адаптивных реакций после рождения и способствует развитию отсроченных патологических состояний (Евсюкова И.И., 2011; Hill D.S. et al., 2015). В основе подобных отклонений лежит так называемый «феномен фенотипической пластичности», обусловленный эпигенетическими механизмами. Предполагается, что эпигенетические изменения могут возникать и при воздействии металлов, являясь одним из механизмов патогенеза нарушений в центральной нервной системе (Martinez-Zamudio R. and Ha H.C., 2011). В ряде исследований удалось связать

такие эпигенетические изменения с различными нарушениями, включая болезнь Альцгеймера, Паркинсона и аутизм (Ijomone O.M. et al., 2020). В работах, проведенных рядом ученых, было показано, что пренатальное воздействие Mn способствовало возникновению эпигенетических изменений, которые приводили к нарушению процесса нейрогенеза и дифференцировки нейронов, а также гибели дофаминергических нейронов у потомства (Tarale P. et al., 2016; Guo Z., 2018; Lindner S. et al., 2022). Таким образом, возможно, что поведенческие и когнитивные нарушения, возникшие у животных второго поколения, были связаны именно с эпигенетическими изменениями, которые могли передаваться им по наследству. Механизм передачи эпигенетических меток между поколениями до конца не изучен. Однако подобные результаты повышают вероятность того, что семейные кластеры заболеваний могут иметь экологическую и эпигенетическую основу.

В ходе анализа корреляционных матриц во всех опытных группах был установлен ряд зависимостей между уровнем химических элементов разных биосубстратов и морфобиохимическими показателями крови. Однако особый интерес с точки зрения диагностики представляет выявление ассоциаций между уровнем элементов сыворотки крови и коры головного мозга, благодаря которым можно судить о состоянии минерального обмена последнего. Согласно данному анализу было показано наличие положительной корреляционной связи во всех опытных группах между сывороточным уровнем Mg и Mg коры головного мозга, а также между уровнем Cu сыворотки и Cu серого вещества. Таким образом, нарушение баланса сывороточных уровней Mg и Cu может служить прогностическим признаком нарушения гомеостаза данных элементов в коре головного мозга. Следует сказать о физиологической важности данных элементов в функционировании центральной нервной системы. Одна из функций Mg в организме, как было описано ранее, связана с регуляцией нейрхимической передачи, в связи с чем нарушение уровня данного макроэлемента в тканях головного мозга может способствовать развитию неврологических расстройств (Ayuk J. and Gittoes N.J., 2014; Du K. et al., 2022). Cu также играет важную роль в

организме, участвуя в формировании каталитических центров и стабилизации регуляторных сайтов в составе многих ферментов, задействованных в окислительно-восстановительных реакциях и синтезе нейромедиаторов (Костина О.В. и др., 2020; Bisaglia M. and Vubacco L., 2020; Gromadzka G. et al., 2020;). Подобные факты еще раз подтверждает клиническую значимость контроля уровня данных элементов.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Таким образом, результаты проведенного исследования и анализ научной литературы позволили изучить закономерности формирования элементного гомеостаза и поведенческих реакций у потомства, подвергшегося в период пренатального развития стрессорному воздействию Mn. Показано, что хронический стресс, обусловленный воздействием Mn в период физиологической беременности, приводит к задержке физического развития, устойчивым нарушениям двигательного, эмоционального и исследовательского компонентов поведения, формирования памяти и способности к обучению в ближайшем и в последующем поколении потомства. Выявленные изменения в поведенческом и когнитивном контуре сопровождаются широким спектром нарушений обмена веществ, среди которых ключевое место занимает изменение метаболизма макро- и микроэлементов.

Полученные результаты исследования углубляют и расширяют представления о влиянии хронического стресса, обусловленного воздействием Mn в течение физиологической беременности, на становление функциональных систем организма двух поколений.

Результаты исследования способствуют пониманию закономерностей и механизмов поддержания элементного гомеостаза в процессе адаптации к факторам внешней среды, представляют интерес с позиции охраны здоровья матери и ребенка, а также механизмов формирования патофизиологических состояний.

Критический анализ полученных результатов позволил прийти нам к следующим **выводам**.

## ВЫВОДЫ

1. При стресс-потенцирующем воздействии Мп на самок крыс в прегестационный период развивается общая неспецифическая адаптационная реакция повышенной активации у 33 % животных, что свидетельствует о напряжении механизмов адаптации; отмечается ухудшение репродуктивного потенциала, что выражается снижением индекса продуктивности на 20 %, индекса беременности на 11,5 %, наступлением более ранней родовой деятельности на 1,6 дней.

2. Хроническое субтоксическое воздействие Мп на самок крыс в пре- и гестационный периоды приводит к нарушению морфогенеза и формированию дисфункциональных отклонений в физическом развитии потомства первого поколения, что выражается ухудшением веса-ростовых показателей животных – отмечается малый размер тела крысят и низкий вес при рождении (на 20 %), который сохраняется в ходе всего онтогенеза, выявлены более поздние сроки открытия глаз (на 2,5 суток) в сочетании с развитием гиперактивного поведения, ухудшением пространственной ориентации и способности к обучению в половозрелом возрасте; тогда как у потомства второго поколения регистрируется задержка роста крысят на ранних этапах постнатального развития (1-3 неделя), которая нивелируется по мере взросления, в совокупности с ухудшением пространственной памяти в половозрелом возрасте.

3. При хроническом субтоксическом воздействии Мп на самок крыс в пре- и гестационный периоды отмечается нарушение метаболического гомеостаза в материнском организме, что сопровождается увеличением уровня глюкозы на 80 %, холестерина на 11 % и триглицеридов на 72 % на фоне снижения уровня общего белка на 37 % и альбумина на 21 %; в организме половозрелого потомства первой линии отмечается повышение уровня холестерина на 73 %, триглицеридов на 85 % и снижение уровня общего белка на 18 %; у животных второй линии исключением является холестерин, уровень которого превышает контроль на 38 %.

4. В условиях хронического стресс-воздействия Mn на самок крыс в пре- и гестационный периоды выявлены закономерности формирования элементного статуса: в сыворотке крови материнского организма отмечается высокий уровень Mn на фоне более низкого содержания Ca, K, Mg, Cu и Fe, в коре головного мозга отмечается накопление тяжелых металлов Mn, Pb, Hg и Sr на фоне снижения уровня Fe и I; у животных первого поколения в сыворотке крови установлен более низкий уровень K, Mg, Fe и Zn, в коре головного мозга – Mg, Fe, Se и Co на фоне повышенного содержания Mn. Данные изменения сопровождаются адаптационно-компенсаторной активацией ферментных систем, что выражается повышением сывороточного уровня марганецсодержащих ферментов – супероксиддисмутазы на 133 % и аргиназы на 183 % у самок крыс; уровня аргиназы на 28 % у животных первого поколения.

5. В условиях стресс-потенцирующего воздействия Mn на самок крыс в пре- и гестационном периодах установлены закономерности распределения металл-лигандных форм данного химического элемента в сыворотке крови животных: отмечается снижение адаптационно-функциональных резервов материнского организма и потомства первой линии за счет повышенного образования низкомолекулярной фракции Mn, способствующей избыточному накоплению тяжелого металла в головном мозге, на фоне чего Mn оказывает нейротоксическое действие, что сопровождается увеличением содержания белка S100B в сыворотке крови самок крыс на 84 %, а также выражается дисфункциональными отклонениями деятельности холинергической системы, характеризующиеся повышением уровня ацетилхолинэстеразы в крови животных первого поколения на 47 %.

6. Наиболее выраженная внутри- и межсистемная интеграция показателей элементного статуса, функционального состояния метаболической системы и ферментативной подсистемы отмечается в организме самок крыс в условиях повышенного перорального поступления Mn в прегестационный период. Независимо от группы наблюдения, выявлены интегральные взаимосвязи между сывороточным уровнем Mg и общим белком, аргиназой; Fe и гемоглобином; Zn и

эритроцитами, холестерином, супероксиддисмутазой; Cu и лейкоцитами; Mn и глюкозой, супероксиддисмутазой; уровнем химических элементов в коре головного мозга Mg, Cu, Mn и ацетилхолинэстеразой; Mg, Zn и белком S100B; сывороточным уровнем Mg/Cu и содержанием данных элементов в коре головного мозга, что в совокупности свидетельствует о напряжении в работе регуляторных адаптационных механизмов.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Женщинам фертильного возраста, проживающих в районах с высокой экологической нагрузкой, в период прекоцепции, а также беременным женщинам в период органогенеза у плода, характеризующегося высокой дифференцировкой тканей и формированием органов, включая закладку нервной трубки с последующим развитием головного мозга, и в период системогенеза, характеризующегося формированием высшей структуры центральной нервной системы, рекомендуется проведение многоэлементного анализа сыворотки крови для определения элементного статуса женского организма и своевременной профилактики и коррекции дисэлементозов с целью сохранения репродуктивного здоровья женщин, снижения частоты и тяжести развития гестационных осложнений, формирования психомоторных и соматических расстройств у новорожденных и взрослого потомства.

2. Результаты проведенного исследования позволяют рекомендовать проводить оценку сывороточного уровня низкомолекулярной фракции марганца в условиях стресс-потенцирующего антропогенного загрязнения среды обитания в качестве предиктора накопления Mn в головном мозге, и как следствие, развития марганец-зависимых неврологических расстройств.

3. Разработанная модель энцефалопатии у потомства, обусловленная воздействием субтоксичных доз Mn на материнский организм в период физиологической беременности, может быть использована для экспериментального изучения механизмов, способствующих развитию адаптивных и дезадаптивных фенотипов потомства.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Приведенные данные указывают на высокую актуальность и научно-практическую значимость дальнейшего исследования механизмов, лежащих в основе реализации адаптационно-компенсаторных процессов в женском организме и потомстве в условиях повышенного антропогенного воздействия Mn. Особое значение приобретает изучение эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов, включая специфические модификации ДНК и гистонов, в реакции на хроническое стрессорное воздействие Mn в период физиологической беременности.

Выявленные нарушения метаболического и элементного гомеостаза, поведенческих и когнитивных способностей у половозрелого потомства, подвергавшегося в период пренатального развития стрессорному воздействию Mn, свидетельствуют о необходимости поиска способов пре- и постнатальной диагностики, коррекции негативных последствий воздействия.

Полученные данные могут быть перспективны в плане разработки нового персонализированного подхода по эффективному и безопасному назначению марганецсодержащих биологически активных добавок к пище на основе оценки валового содержания Mn и его отдельных химических форм в сыворотке крови.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аврущенко, М.Ш. Значение нейроморфологических исследований в изучении постреанимационной патологии организма: развитие взглядов академика В.А. Неговского / М.Ш. Аврущенко, В.В. Мороз, И.В. Острова // Общая реаниматология. – 2009. – Т. 1. – С. 14-20.
2. Авцын, А.П. Микроэлементозы человека / А.П. Авцын, А.А. Жаворонков, М.А. Риш и др. – М.: Медицина, 1991. – 464 с.
3. Агаджанян, Н.А. Нормальная физиология / Н.А. Агаджанян, В.М. Смирнов. – М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2012. – 576 с.
4. Агаджанян, Н.А. Проблемы адаптации и учение о здоровье: учебное пособие / Н.А. Агаджанян, Р.М. Баевский, А.П. Берсенева. – М.: Изд-во Рос. ун-та дружбы народов, 2006. – 223 с.
5. Агаджанян, Н.А. Физиологические особенности женского организма / Н.А. Агаджанян, И.В. Радыш, Г.М. Куцов. – М.: Изд-во РУДН, 1996. – 98 с.
6. Айсувакова, О.П. Speciation-анализ соединений химических элементов в объектах окружающей среды: современное представление / О.П. Айсувакова // Микроэлементы в медицине. – 2018. – Т. 19. – № 2. – С. 12-26.
7. Аксенов, А.Н. Перинатальный стресс: этиопатогенетические факторы развития у новорожденных / А.Н. Аксенов, Л.С. Логутова, И.И. Бочарова и др. // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2022. – Т. 22. – № 3. – С. 21-29.
8. Амикишиева, А.В. Поведенческое фенотипирование: современные методы и оборудование / А.В. Амикишиева // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2009. – № 3. – С. 529-542.
9. Анохин, П.К. Очерки физиологии функциональных систем / П.К. Анохин. – М.: Медицина, 1975. – 225 с.
10. Аршавский, И.А. Очерки по возрастной физиологии / И.А. Аршавский. – М.: Медицина, 1967. – 476 с.
11. Бабенко, Г.А. Микроэлементы в экспериментальной и клинической



медицине / Г.А. Бабенко. – Киев: Здоров'я, 1965. – 183 с.

12. Баевский, Р.М. Введение в донозологическую диагностику / Р.М. Баевский, А.П. Берсенева. – Москва: Слово, 2008. – 176 с.

13. Безруких, М.М. Возрастная физиология: (Физиология развития ребенка) / М.М. Безруких, В.Д. Сонькин, Д.А. Фарбер. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 416 с.

14. Бережнова, Т.А. Влияние сквалена на некоторые параметры состояния репродуктивной системы самок крыс в эксперименте / Т.А. Бережнова, Н.С. Преображенская, А.Д. Брездынюк и др. // Вестник новых медицинских технологий. – 2016. – Т. 23. – № 4. – С. 149-154.

15. Березов, Т.Т. Полиамины: их роль в норме и при патологии центральной нервной системы *Анналы клинической и экспериментальной неврологии* / Т.Т. Березов, М.Г. Маклецова, Т.Н. Федорова // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. – 2012. – Т.6. – № 2. – С. 38-42.

16. Блинов, Д.В. Современные представления о роли нарушения резистентности гематоэнцефалического барьера в патогенезе заболеваний ЦНС. Часть 2: функции и механизмы повреждения гематоэнцефалического барьера / Д.В. Блинов // *Эпилепсия и пароксизмальные состояния*. – 2014. – Т. 6. – № 1. – С. 70-84.

17. Блинов, Д.В. Современные представления о роли нарушения резистентности гематоэнцефалического барьера в патогенезе заболеваний ЦНС. Часть 1: Строение и формирование гематоэнцефалического барьера / Д.В. Блинов // *Эпилепсия и пароксизмальные состояния*. – 2013. – Т. 5. – № 3. – С. 65-75.

18. Блум, Ф. Мозг, разум и поведение / Ф. Блум, А. Лейзерсон, Л. Хофстедтер. – М.: Мир, 1988. – 248 с.

19. Василевская, Е.И. Неорганическая химия: учебное пособие / Е.И. Василевская, О.И. Сечко, Т.Л. Шевцова. – Минск: РИПО, 2019. – 248 с.

20. Васильев, А.А. Тяжелые металлы в почвах города Чусового: оценка и диагностика загрязнения: монография / А.А. Васильев, А.Н. Чашин. – Пермь:

ФГБОУ ВПО Пермская ГСХА, 2011. – 197 с.

21. Владимирская, Т.Э. Определение фаз эстрального цикла белых крыс по клеточному составу влагалищных мазков / Т.Э. Владимирская, И.А. Швед, С.Г. Криворот и др. // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. – 2011. – № 4. – С. 88-91.

22. Войнар, А.О. Биологическая роль микроэлементов в организме животных и человека / А.И. Войнар. – Москва: Высш. школа, 1960. – 544 с.

23. Гаркави, Л.Х. / Адаптационные реакции и резистентность организма // Л.Х. Гаркави, Е.Б. Квакина, М.А. Уколова. – Ростов-на-Дону: Издательство Ростовского университета, 1990. – 224 с.

24. Гармашева, Н.Л. Введение в перинатальную медицину / Н.Л. Гармашева, Н.Н. Константинова – М.: Медицина, 1978. – 296 с.

25. Гелашвили, О.А. Вариант периодизации биологически сходных стадий онтогенеза человека и крысы / О.А. Гелашвили // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2008. – Т. 4. – № 4. – С. 125-126.

26. ГН 2.1.5.1315-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования».

27. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 году». – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2023. – 368 с.

28. Дзяк, Л.А. Роль холинергического дефицита в патогенезе психоневрологических заболеваний / Л.А. Дзяк, Е.С. Цуркаленко // Международный неврологический журнал. – 2019. – Т. 105. – № 3. – С. 39-47.

29. Евстафьева, Е.В. Современные аспекты экологической медицины: теория и практика на Крымском полуострове: моногр. / Е.В. Евстафьева, Е.В. Ясенева, Н.А. Сологуб и др. – Москва: «Научно-издательский центр ИНФРА-М», 2023. – 251 с.

30. Евсюкова, И.И. Механизмы программирования заболеваний потомства

при акушерской патологии / И.И. Евсюкова // Журнал акушерства и женских болезней. – 2011. – № 3. – С. 197-202.

31. Ермакова, Н.В. Глоссарий основных физиологических терминов / Н.В. Ермакова, В.И. Торшин, З.В. Бакаева и др. – М.: РУДН. – 2019. – 195 с.

32. Заваденко, Н.Н. Недоношенность и низкая масса тела при рождении как факторы риска нарушений нервно-психического развития у детей / Н.Н. Заваденко, Л.А. Давыдова // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2018. – Т. 63. – № 4. – С. 42-51.

33. Зайцев, В.М. Прикладная медицинская статистика: учебно-практическое пособие / В.М. Зайцев. – М.: Фолиант, 2006. – 432 с.

34. Зайцева, Н.В. Негативные эффекты наночастиц оксида марганца при ингаляционном поступлении в организм / Н.В. Зайцева, М.А. Землянова, Т.И. Акафьева // Экология человека. – 2013. – С. 25-29.

35. Информационный бюллетень о состоянии недр на территории Российской Федерации в 2019 г. – Санкт-Петербург: ПК Выбор, 2020. – С. 406.

36. Информационный бюллетень о состоянии недр на территории Российской Федерации в 2020 г. – Санкт-Петербург: ПК Выбор, 2021. – С. 380.

37. Карнищенко, Н.Н. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях: учебное пособие для системы медицинского и фармацевтического послевузовского образования // Н.Н. Карнищенко, С.В. Грачева. – Москва: Профиль-2С, 2010. – 354 с.

38. Катола, В.М. Пыль: источники образования, ее общая характеристика, пылевые заболевания (краткий обзор) / В.М. Катола, В.Е. Комогорцева // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2018. – № 67. – С. 111-116.

39. Кирющенко, А.П. Влияние вредных факторов на плод / А.П. Кирющенко. – М.: Медицина, 1978. – 216 с.

40. Королев, В.А. Особенности репродуктивного процесса у крыс в условиях электромагнитного экранирования / В.А. Королев, М.В. Захарова, Н.С. Ярмолук // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского Серия «Биология, химия». – 2009. – Т. 22. – № 3. – С. 68-74.

41. Котеров, А.Н. Соотношение возрастов основных лабораторных животных (мышей, крыс, хомячков и собак) и человека: актуальность для проблемы возрастной радиочувствительности и анализ опубликованных данных / А.Н. Котеров, Л.Н. Ушенкова, Э.С. Зубенкова, А.А. Вайнсон, А.П. Бирюков // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2018. – Т. 63. – № 1. – С. 5-27.

42. Корчина, Т.Я. Избыточная концентрация марганца в питьевой воде и риск для здоровья населения северного региона / Т.Я. Корчина, Л.А. Миняйло, В.И. Корчин // Здоровье населения и среда обитания. –2018а. – № 2. – С. 28-33.

43. Корчина, Т.Я. Сравнительные показатели содержания железа и марганца в волосах женщин северного региона с различной очисткой питьевой воды / Т.Я. Корчина, Л.А. Миняйло, О.А. Сафарова и др. // Экология человека. – 2018в. – № 4. – С. 4-9.

44. Косенок, В.К. Лазарев Исследование активности аргиназы смешанной слюны при онкологической патологии / В.К. Косенок, Л.В. Бельская, Ж. Массард и др. // Вопросы онкологии. – 2016. – Т. 62. – № 5. – С. 649-653.

45. Костина, О.В. Биологическая роль меди в патогенезе расстройств аутистического спектра у детей: обзор литературы / О.В. Костина, М.В. Преснякова, Ж.В. Альбицкая // Экология человека. – 2020. – № 4. – С. 42-47.

46. Котельников, А.В. Характеристика эстрального цикла белых крыс на разных этапах онтогенеза при введении витамина Е / А.В. Котельников, С.В. Котельникова // Вестник астраханского государственного технического университета. – 2005. – № 3. – С. 215-218.

47. Лемешко, Б.Ю. Сравнительный анализ критериев проверки отклонения распределения от нормального закона / Б.Ю. Лемешко, С.Б. Лемешко // Метрология. – 2005. – № 2. – С. 3-24.

48. Мазунина, Д.Л. Негативные эффекты марганца при хроническом поступлении в организм с питьевой водой / Д.Л. Мазунина // Экология человека. – 2015. – № 3. – С. 25-31.

49. Маршинская, О.В. Содержание микроэлементов в шерсти коров из различных регионов России / О.В. Маршинская, Т.В. Казакова, С.В. Нотова // Животноводство и кормопроизводство. – 2021. – Т.104. – № 3. – С. 8-16.

50. Меерсон, Ф.З. Адаптация, стресс и профилактика / Ф.З. Меерсон. – М.: Наука, 1981. – 278 с.

51. Миняйло, Л.А. Взаимосвязь концентрации марганца в питьевой воде и биосредах у коренного и некоренного населения ханты-мансийского автономного округа / Л.А. Миняйло, Т.Я. Корчина // Научный медицинский вестник Югры. – 2022. – Т. 31. – № 1. – С. 76-81.

52. Миняйло, Л.А. Влияние техногенного загрязнения среды обитания и качества питьевой воды на состояние окислительного метаболизма у населения северного нефтегазодобывающего региона: моногр. / Л.А. Миняйло, Ю.С. Макаева, Т.Я. Корчина и др. – Воронеж: Издательство «Ритм», 2021. – 368 с.

53. Можельский, А.Н. Алгоритмы статистических исследований (с примерами на языке R) / А.Н. Можельский, А.Н. Глухов, Н.В. Ефименко и др. // Курортная медицина. – 2019. – № 1. – С. 87-99.

54. Музыка, Е.А. Дисбаланс микроэлементов во время беременности как фактор развития патологий у детей / Е.А. Музыка, Л.И. Лашенова, Г.А. Ткачева и др. // Микроэлементы в медицине. – 2021. – Т. 22. – № 3. – 15-26 С.

55. МР 2.3.1.0253-21. 2.3.1. Гигиена питания. Рациональное питание. Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации. Методические рекомендации» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 22.07.2021).

56. Некрасов, В.И. О связи нарушений обмена макро- и микроэлементов с заболеваемостью у работников предприятия черной металлургии / В.И. Некрасов // Экология человека. – 2005. – №10. – С. 57-60.

57. Нефьодова, О.О. Влияние соединений кадмия и свинца на морфогенез внутренних органов в онтогенезе / О.О. Нефьодова, И.П. Задесенец, А.И. Гальперин // Вестник проблем биологии и медицины. – 2017. – Т. 3. – № 4. –

С. 61-66.

58. Нотова, С.В. Изучение химических форм меди и марганца в живом организме (обзор) / С.В. Нотова, Т.В. Казакова, О.В. Маршинская // Животноводство и кормопроизводство. – 2020. – Т. 103. – № 1. – С.47-64.

59. Нотова, С.В. Современные методы и оборудование для оценки поведения лабораторных животных (обзор) / С.В. Нотова, Т.В. Казакова, О.В. Маршинская // Животноводство и кормопроизводство. – 2018. – Т. 101. – № 1. – С. 106-115.

60. Нотова, С.В. Элементный статус работников промышленных предприятий г. Оренбурга / С.В. Нотова, В.И. Некрасов, О.О. Фролова // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2005. – № 12. – С. 20-24.

61. Оберлис, Д. Биологическая роль макро- и микроэлементов у человека и животных / Д. Оберлис, Б. Харланд, А. Скальный. – Санкт-Петербург: Наука, 2018. – 542 с.

62. Осадчук, Л.В. Индивидуальный образ жизни и мужская фертильность / Л.В. Осадчук, А.В. Осадчук // Физиология человека. – 2023. – Т. 49. – № 2. – С. 123-136.

63. Осипова, Е.В. Роль химических элементов в деятельности нервной системы (обзор) / Е.В. Осипова // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра сибирского отделения российской академии медицинских наук. – 2005. – Т. 1. – № 39. – С. 79-85.

64. Охрана окружающей среды в России. Статистический сборник. – М.: Росстат, 2020. – 113 с.

65. Панченко, Л.Ф. Клиническая биохимия микроэлементов / Л.Ф. Панченко, И.В. Маев, К.Г. Гуревич. – М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2004. – 363 с.

66. Побилат, А.Е. Марганец в почвах и растениях южной части средней Сибири / А.Е. Побилат, Е.И. Волошин // Микроэлементы в медицине. – 2017. – Т. 18. – № 2. – С. 43-47.

67. Потеева, Т.Е. Общие вопросы метаболизма железа и патогенеза

железодефицитной анемии / Т.Е. Потемина, С.А. Волкова, С.В. Кузнецова и др. // Вестник медицинского института «Реавиз»: реабилитация, врач и здоровье. – 2020. – №3. – С. 125-137.

68. Пухова, Т.Г. Клиническая характеристика заболеваний органов мочевой системы у детей, проживающих в зоне экологического неблагополучия / Т.Г. Пухова, Е.М. Спивак, Е.П. Ситникова // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2022. – Т. 21. – № 1. – С. 233-236.

69. Радыш, И.В. Введение в элементологию / И.В. Радыш, А.В. Скальный, С.В. Нотова и др. – Оренбург: ООО ИПК «Университет», 2017. – 183 с.

70. Радыш, И.В. Элементный статус слюны мужчин различных этнических групп при адаптации к условиям Московского мегаполиса / И.В. Радыш, Т.Н. Умнова, В.В. Скальный // Материалы II научно-практической конференции с международным участием. Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы. – Москва, Изд-во: Российский ун-т дружбы народов. – 2023. – С.71-73.

71. Рафикова, Ю.С. Уровни содержания кадмия и свинца в волосах населения зауральской зоны республики Башкортостан / Ю.С. Рафикова, И.Н. Семенова, Р.Ф. Хасанова, Я.Т. Суюндуков // Экология человека. – 2020. – № 1. – С. 17-24.

72. Светлов, П.Г. Теория критических периодов развития и ее значение для понимания принципов действия среды на онтогенез. Вопросы цитологии и общей физиологии / П.Г. Светлов. – М.:Л., 1960. – 285 с.

73. Ребров, В.Г. Витамины, макро- и микроэлементы / В.Г. Ребров, О.А. Громова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 960 с.

74. Роговин, К.А. Стресс в раннем онтогенезе как адаптивное явление / К.А. Роговин // Журнал общей биологии. – 2019. – № 80. – С. 95-123.

75. Рыбалкин, С.П. Экспериментальная оценка влияния препарата Кагоцел на генеративную функцию животных / С.П. Рыбалкин, Е.В. Ковалева, Т.А. Гуськова и др. // Токсикологический вестник. – 2013. – Т. 119. – № 2. –

С. 33-38.

76. Савченков, Ю.И. Очерки физиологии и морфологии функциональной системы мать-плод / Ю.И. Савченков, К.С. Лобынцев. – М.: Медицина, 1980. – 253 с.

77. Сальникова, Е.В. Микроэлементный статус населения Оренбургской области / Е.В. Сальникова, Т.И. Бурцева, А.В. Скальный // Экология человека. – 2019. – № 1. – С.10-14.

78. СанПиН 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству питьевой воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества».

79. Селье, Г. Очерки об адаптационном синдроме / Перевод с англ. В.И. Кандрора и А.А. Рогова; Ред. и вступ. статья проф. М.Г. Дурмишьяна. – М.: Медгиз, 1960. – 254 с.

80. Сембаев, Ж.Х. Загрязнение почвенного покрова горнорудных территорий республик Казахстан и Башкортостан тяжелыми металлами / Ж.Х. Сембаев, Г.Р. Хантурина, З.Б. Бактыбаева и др. // Медицина труда и экология человека. – 2019. – № 1. – С. 16-22.

81. Сидорова, И.С. Течение и ведение беременности по триместрам / И.С. Сидорова, И.О. Макаров. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2009. – 304 с.

82. Скальная, М.Г. Гигиеническая оценка влияния минеральных компонентов рационального питания и среды обитания на здоровье населения мегаполиса / М.Г. Скальная: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. – М., 2005. – 42 с.

83. Скальная, М.Г. Микроэлементы: биологическая роль и значение для медицинской практики. Сообщ. 3. Марганец / М.Г. Скальная, А.В. Скальный // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2015. – № 3. – С. 14-25.

84. Скальный, А.В. Изучение элементного статуса населения различных промышленных районов как индикатора экологического загрязнения /



А.В. Скальный, А.Е. Побилат, А.А. Киричук и др. // АгроЭкоИнфо. – 2023. – № 6. – С. 1-10.

85. Скальный, А.В. Оценка и коррекция элементного статуса населения – перспективное направление отечественного здравоохранения и экологического мониторинга / А.В. Скальный // Микроэлементы в медицине. – 2018. – Т. 19. – № 1. – С. 5-13.

86. Скальный, А.В. Медицинская элементология: учебное пособие / А.В. Скальный, М.Г. Скальная, А.А. Киричук и др. – М.: Российский ун-т дружбы народов, 2018. – 222 с.

87. Скальный, А.В. Региональные особенности элементного гомеостаза как показатель эколого-физиологической адаптации / А.В. Скальный, С.А. Мирошников, С. В. Нотова и др. // Экология человека. – 2014. – 14-17 С.

88. Скальный, А.В. Химические элементы в физиологии и экологии человека / А.В. Скальный. – М.: Издательский дом «ОНИКС 21 век: Мир, 2004. – 216 с.

89. Скальный, А.В. Элементный статус населения России. Часть 2. Элементный статус населения Центрального федерального округа / А.В. Скальный, Л.И. Афтанас, Е.С. Березкина и др. – СПб.: Медкнига «ЭЛБИ-СПб», 2011. – 382 с.

90. Скальный, А.В. Элементный статус населения России. Часть 3. Элементный статус населения Северо-Западного, Южного и Северо-Кавказского федеральных округов / А.В. Скальный, Л.И. Афтанас, Е.С. Березкина, Е.Ю. Бонитенко, Т.И. Бурцева, В.И. Вареник, А.Р. Грабеклис, В.А. Демидов, М.Ф. Киселев, В.А. Николаев, М.Г. Скальная. – СПб.: Медкнига «ЭЛБИ-СПб», 2012. – 448 с.

91. Скальный, А.В. Элементный статус населения России. Часть 4. Элементный статус населения Приволжского и Уральского федеральных округов // А.В. Скальный, Л.И. Афтанас, Е.С. Березкина, и др. – СПб.: Медкнига «ЭЛБИ-СПб», 2013. – 576 с.

92. Скальный, А.В. Элементный статус населения России. Часть 5.

Элементный статус населения Сибирского и Дальневосточного федеральных округов // А.В. Скальный, Л.И. Афтанас, Е.С. Березкина и др. – СПб.: Медкнига «ЭЛБИ-СПб», 2014. – 544 с.

93. Скальный, В.В. Элементный статус работников ОАО «Северсталь» / В.В. Скальный, В.И. Некрасов, И.О. Мясников // Микроэлементы в медицине. – 2006. – Т. 7. – № 2. – С. 47-52.

94. Состояние загрязнения атмосферы в городах на территории России за 2019 г: ежегодник. – Санкт-Петербург: ФГБУ «ГГО» Росгидромета, 2020. – 249 с.

95. Состояние загрязнения атмосферы в городах на территории России за 2018 г: ежегодник. – Санкт-Петербург: ФГБУ «ГГО» Росгидромета, 2019. – 251 с.

96. Стифеев, А.И. Состояние почв российской Федерации и основные направления стабилизации и повышения их плодородия / А.И. Стифеев, Е.А. Бессонова, О.В. Никитина и др. // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2015. – № 1. – С. 49-52.

97. Стратилов, В.А. Ассоциированные с возрастом изменения исследовательской активности в тесте «открытое поле» у крыс, переживших пренатальную гипоксию / В.А. Стратилов, О.В. Ветровой, Л.А. Ватаева и др. // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. – 2021. – Т. 71. – № 3. – С. 428-436.

98. Стрижаков, А.Н. Критическое состояние плода: диагностические критерии, акушерская тактика, перинатальные исходы / А.Н. Стрижаков, И.В. Игнатко, Е.В. Тимохина и др. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. – 176 с.

99. Судаков, К.В. Системные механизмы поведения / К.В. Судаков, М. Баич. – М.: Медицина, 1990. – 240 с.

100. Тармаева, И.Ю. Минеральные вещества, витамины: их роль в организме. Проблемы микронутриентной недостаточности: учебное пособие / И.Ю. Тармаева, А.В. Боева. – Иркутск: ИГМ, 2014. – 89 с.

101. Тихонов, М.Н. Металлоаллергены в общей проблеме безопасности жизнедеятельности человека / М.Н. Тихонов, В.Н. Цыган // Вестник российской военно-медицинской академии. – 2010. – № 1. – С. 3-22.

102. Третьякова, Ю.Д. Неорганическая химия. Химия переходных элементов / Ю.Д. Третьякова, А.А. Дроздов, В.П. Зломанов и др. – М.: Издательский центр «Академия», 2007. – 352 с.

103. Тутельяна, В.А. Справочник по диетологии / В.А. Тутельян, М.А. Самсонова. – М.: Медицина, 2002. – 541 с.

104. Тышко, Н.В. Сравнительная характеристика влияния экспериментальных рационов на рост и развитие крыс / Н.В. Тышко, В.М. Жминченко, В.А. Пашорина и др. // Вопросы питания. – 2011. – Т. 80. № 5. – С. 30-38.

105. Узбеков, М.Г. Перекисное окисление липидов и антиоксидантные системы при психических заболеваниях. Сообщение III / М.Г. Узбеков // Социальная и клиническая психиатрия. – 2016. – Т. 26. – № 2. – С. 91-96.

106. Улахович, Н.А. Металлы в живых организмах / Н.А. Улахович, Э.П. Медянцева, С.С. Бабкина и др. – Казань: Казанский университет, 2012. – 102 с.

107. Хлебникова, Н.Н. Неонатальное действие ингибитора дипептидилпептидазы IV дипротина А приводит к формированию гиперактивного фенотипа и длительному повышению агрессивности у крыс / Н.Н. Хлебникова, С.Д. Ширенова, Н.А. Крупина // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2021. – Т. 65. – № 4. – С. 4-16.

108. Хомченко, Г.П. Неорганическая химия / Г.П. Хомченко, И.К. Цитович. – М.: Высш. шк. – 1987. – 464 с.

109. Федоров, Б.М. Стресс и система кровообращения / Б.М. Федоров. – М.: Медицина, 1990. – 320 с.

110. Цыган, В.Н. Патофизиология обмена веществ: учебное пособие / В.Н. Цыган. – СПб: СпецЛит, 2013. – 335 с.

111. Чашин, М.В. Оценка экспозиции к соединениям марганца и железа у сварщиков / М.В. Чашин, Д.Г. Эллинген, В.П. Чашин и др. // Здоровье населения и среда обитания. – 2014. – № 10. – С. 28-31.

112. Чегус, Л.А. Корреляция показателей углеводно-липидного обмена и

элементного статуса у женщин с макросомией плода, проживающих на Севере / Л.А. Чегус, В.И. Корчин, Т.Я. Корчина // Экология человека. – 2018. – № 1. – С. 41-46.

113. Черногаева, Г.М. Обзор состояния и загрязнения окружающей среды в Российской Федерации за 2021 год / Г.М. Черногаева, Л.Р. Журавлева, Ю.А. Малеванов, Ю.В. Пешков, М.Г. Котлякова, Т.А. Красильникова. – М.: Федеральная служба по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды (Росгидромет), 2022. – 220 с.

114. Черногаева, Г.М. Обзор состояния и загрязнения окружающей среды в Российской Федерации за 2020 год / Г.М. Черногаева, Л.Р. Журавлева, Ю.А. Малеванов, Ю.В. Пешков, М.Г. Котлякова, Т.А. Красильникова. – М.: Федеральная служба по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды (Росгидромет), 2021. – 217 с.

115. Черногаева, Г.М. Обзор состояния и загрязнения окружающей среды в Российской Федерации за 2019 год / Г.М. Черногаева, Л.Р. Журавлева, Ю.А. Малеванов, Ю.В. Пешков, М.Г. Котлякова, Т.А. Красильникова. – М.: Федеральная служба по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды (Росгидромет), 2020. – 247 с.

116. Шаханова, А.В. Нейроэндокринные и вегетативные механизмы физиологии развития: новые концептуальные подходы / А.В. Шаханова // Материалы Международной научной конференции, посвященной 75-летию Адыгейского государственного университета. – Майкоп: Изд-во «Адыгейский государственный университет». – 2015. – С. 146-162.

117. Шестакова, Е.В. Проблемы и перспективы развития промышленных предприятий региона / Е.В. Шестакова, А.М. Ситжакова, Р.М. Прытков // Научный результат. Экономические исследования. – 2023. – Т. 9. – № 1. – С. 72-84.

118. Шматова, Ю.Е. Динамика статистических и социологических показателей состояния психического здоровья населения России / Ю.Е. Шматова // Проблемы развития территории. – 2019. – № 3. – С.76-96.

119. Штина, И.Е. Оценка эффективности технологии профилактики нарушений физического развития и недостаточности питания, ассоциированных с воздействием металлов (свинец, марганец, никель, кадмий, хром), у детей / И.Е. Штина, К.П. Лужецкий, О.Ю. Устинова // Здоровье населения и среда обитания. – 2017. – № 4. – С. 38-42.

120. Шукуров, Ф.А. Донозологические состояния организма / Ф.А. Шукуров, Ф.Т. Халимова // Биология и интегративная медицина. – 2019. – С. 68-80.

121. Adamson, S.X. Subchronic Manganese Exposure Impairs Neurogenesis in the Adult Rat Hippocampus / S.X. Adamson, X. Shen, W. Jiang et al. // Toxicol Sci. – 2018. – Vol. 163. – № 2. – P. 592-608.

122. Aguilera, A. Health risk of heavy metals in street dust / A. Aguilera, F. Bautista, A. Goguitchaichvili et al. // Frontiers in Bioscience. – 2021. – Vol. 26. – № 2. – P. 327-345.

123. Ajsuvakova, O.P. Alteration of iron (Fe), copper (Cu), zinc (Zn), and manganese (Mn) tissue levels and speciation in rats with desferioxamine-induced iron deficiency / O.P. Ajsuvakova, M.G. Skalnaya, B. Michalke et al. // Biometals. – 2021. – Vol. 34. – № 4. – P. 923-936.

124. Ajsuvakova, O.P. Assessment of copper, iron, zinc and manganese status and speciation in patients with Parkinson's disease: A pilot study / O.P. Ajsuvakova, A.A. Tinkov, D. Willkommen et al. // J Trace Elem Med Biol. – 2020. – № 59. – P. 126423.

125. Ali, H. Environmental Chemistry and Ecotoxicology of Hazardous Heavy Metals: Environmental Persistence, Toxicity, and Bioaccumulation / H. Ali, E. Khan, I. Ilahi // Journal of Chemistry. – 2019. – P. 1-14.

126. Al-Lozi, A. Cognitive control dysfunction in workers exposed to manganese-containing welding fume / A. Al-Lozi, S.S. Nielsen, T. Hershey et al. // American Journal of Industrial Medicine. – 2017. – Vol. 60. – № 2. – P.181-188.

127. Amos-Kroohs, R.M. Developmental manganese neurotoxicity in rats: Cognitive deficits in allocentric and egocentric learning and memory / R.M. Amos-

Kroohs, L.L. Davenport, N. Atanasova et al. // *Neurotoxicol Teratol.* – 2017. – № 59. – P. 16-26.

128. Anderson, B.M. The effects of dietary manganese and thiamine levels on growth rate and manganese concentration in tissues of rats / B.M. Anderson, H.E. Parker // *J. Nutr.* – 1955. – № 57. – P. 55-59.

129. Apostoli, P. Are current biomarkers suitable for the assessment of manganese exposure in individual workers? / P. Apostoli, R. Lucchini, L. Alessio // *Am J Ind Med.* – 2000. – Vol. 37. – № 3. – P. 283-290.

130. Arrais, A.C. S100B protein: general characteristics and pathophysiological implications in the Central Nervous System / A.C. Arrais, L.H.M.F. Melo, B. Norrara et al. // *Int J Neurosci.* – 2022. – Vol. 132. – № 3. – P. 313-321.

131. Aschner, J.L. Nutritional aspects of manganese homeostasis / J.L. Aschner, M. Aschner // *Molecular Aspects of Medicine.* – 2005. – Vol. 26. – P. 353-362.

132. Aschner, M. Manganese / M. Aschner, K. Erikson // *Advances in Nutrition.* – 2017. – Vol. 8. – № 3. – P. 520-521.

133. Ashley-Martin, J. Maternal and cord blood manganese (Mn) levels and birth weight: The MIREC birth cohort study / J. Ashley-Martin, L. Dodds, T.E. Arbuckle et al. // *Int J Hyg Environ Health.* – 2018. – Vol 221. – № 6. – P. 876-882.

134. Ayuk, J. Contemporary view of the clinical relevance of magnesium homeostasis / J. Ayuk, N.J. Gittoes // *Ann Clin Biochem.* – 2014. – Vol. 51. – № 2. – P. 179-188.

135. Avila, D.S. Manganese in health and disease / D.S. Avila, R.L. Puntel, M. Aschner // *Metal ions in life sciences.* – 2013. – Vol.13. – P. 199-227.

136. Azadmanesh, J. Direct detection of coupled proton and electron transfers in human manganese superoxide dismutase / J. Azadmanesh, W.E. Lutz, L. Coates et al. // *Nature Communications.* – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 2079.

137. Babür, E. Deficiency but Not Supplementation of Selenium Impairs the Hippocampal Long-Term Potentiation and Hippocampus-Dependent Learning / E. Babür, B. Tan, M. Yousef et al. // *Biol. Trace Elem. Res.* – 2019. – Vol. 192. – № 2.

– P. 252-262.

138. Bai, S.P. Kinetics of manganese absorption in ligated small intestinal segments of broilers / S.P. Bai, L. Lu, X.G. Luo et al. // Poultry Science Association. – 2008. – Vol. 87. – № 12. – P. 2596-604.

139. Bailey, L.A. Derivation of an occupational exposure level for manganese in welding fumes / L.A. Bailey, L.E. Kerper, J.E. Goodman // NeuroToxicology. – 2018. – Vol. 64. – P. 166-176.

140. Baj, J. Consequences of Disturbing Manganese Homeostasis / J. Baj, W. Flieger, A. Barbachowska et al. // J. Int J Mol Sci. – 2023. – Vol. 24. – № 19. – P. 14959.

141. Balachandran, R.C. Brain manganese and the balance between essential roles and neurotoxicity / R.C. Balachandran, S. Mukhopadhyay, D. McBride et al. // J Biol Chem. – 2020. – Vol. 295. – № 19. – P. 6312-6329.

142. Balasundaram, P. Human Growth and Development / P. Balasundaram, I.D. Avulakunta. – StatPearls Publishing, 2022.

143. Bałasz, M. Perinatal manganese exposure and hydroxyl radical formation in rat brain / M. Bałasz, R. Szkilnik, R. Brus et al. // Neurotoxicity Research. – 2015. – Vol. 27. – № 1. – P. 1-14.

144. Baly, D.L. Pyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in developing rats: effect of manganese deficiency / D.L. Baly, C.L. Keen, L.S. Hurley // J Nutr. – 1985. – Vol. 115. – № 7. – P. 872-879.

145. Baly, D.L. Effect of manganese deficiency on insulin secretion and carbohydrate homeostasis in rats / D.L. Baly, D.L. Curry, C.L. Keen et al. // J Nutr. – 1984. – Vol. 114. – № 8. – P. 1438-1446.

146. Batschauer, A.R. Behavioral and neurochemical effects in mice after one-generation exposure to low doses of manganese: Focus on offspring development / A.R. Batschauer, T.L. Souza, P.E. Manuitt Brito, et al. // Chem Biol Interact. – 2021.

147. Beasley, T.E. Impacts of a perinatal exposure to manganese coupled with maternal stress in rats: Maternal somatic measures and the postnatal growth and development of rat offspring / T.E. Beasley, K.L. McDaniel, W.M. Oshiro et al. //

Neurotoxicol Teratol. – 2022. – Vol. 90. – № 1. – P. 107061.

148. Beaudin, S.A. Early Postnatal Manganese Exposure Causes Lasting Impairment of Selective and Focused Attention and Arousal Regulation in Adult Rats / S.A. Beaudin, B.J. Strupp, M. Strawderman et al. // Environ Health Perspect. – 2017. – Vol. 125. – № 2. – P. 230-237.

149. Betharia, S. Neurobehavioral effects of lead and manganese individually and in combination in developmentally exposed rats / S. Betharia, T.J. Maher // Neurotoxicology. – 2012. – Vol. 33. – № 5. – P. 1117-11127.

150. Bisaglia, M. Copper Ions and Parkinson's Disease: Why Is Homeostasis So Relevant? / M. Bisaglia, L. Bubacco // Biomolecules. – 2020. – Vol. 10. – № 2. – P. 195.

151. Blamey, F.P.C. Manganese distribution and speciation help to explain the effects of silicate and phosphate on manganese toxicity in four crop species / F.P.C. Blamey, B.A. McKenna, C. Li et al. // New Phytol. – 2018. – Vol. 217. – № 3. – P. 1146-1160.

152. Blanc, P.D. The early history of manganese and the recognition of its neurotoxicity, 1837-1936 / P.D. Blanc // Neurotoxicology. – 2018. – Vol. 64. – P. 5-11.

153. Bouchard, M.F. Low level exposure to manganese from drinking water and cognition in school-age children / M.F. Bouchard, C. Surette, P. Cormier et al. // Neurotoxicology. – 2018. – № 64. – P. 110-117.

154. Boycott, K.M. Autosomal-Recessive Intellectual Disability with Cerebellar Atrophy Syndrome Caused by Mutation of the Manganese and Zinc Transporter Gene SLC39A8 / K.M. Boycott, C.L. Beaulieu, K.D. Kernohan et al. // American journal of human genetics. – 2015. – P. 97. – № 6. – P. 886-893.

155. Braun, J.M. Residential dust lead levels and the risk of childhood lead poisoning in United States children / J.M. Braun, K. Yolton, N. Newman et al. // Pediatric Research. – 2021. – Vol. 90. – № 4. – P. 896-902.

156. Brenneman, K.A. Manganese-induced developmental neurotoxicity in the CD rat: is oxidative damage a mechanism of action / K.A. Brenneman, R.C. Cattley,



S.F. Ali et al. // *Neurotoxicology*. – 1999. – № 20. – P. 477-487.

157. Brock, A.A. Dietary manganese deficiency decreases rat hepatic arginase activity / A.A. Brock, S.A. Chapman, E.A. Ulman et al. // *Journal of Nutrition*. – 1994. – Vol. 124. – № 3. – P. 340-344.

158. Buccafusco, J.J. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009.

159. Budinger, D. The role of manganese dysregulation in neurological disease: emerging evidence / D. Budinger, S. Barral, A.K.S. Soo et al. // *The Lancet Neurology*. – 2021. – Vol. 20. – № 11. – P. 956-968.

160. Buthieau, A.M. The effect of  $Mn^{2+}$  on thyroid iodine metabolism in rats / A.M. Buthieau, N. Autissier // *C R Seances Soc Biol Fil*. – 1977. – Vol. 171. – № 5. – P. 1024-1028.

161. Caldwell, R.W. Arginase: A Multifaceted Enzyme Important in Health and Disease / R.W. Caldwell, P.C. Rodriguez, H.A. Toque et al. // *Physiological Reviews*. – 2018. – Vol. 98. – 2. – P. 641-665.

162. Campanari, M.L. Increased Expression of Readthrough Acetylcholinesterase Variants in the Brains of Alzheimer's Disease Patients / M.L. Campanari, F. Navarrete, S.D. Ginsberg et al. // *Journal of Alzheimer's Disease* – 2016. – Vol. 53. – № 3. – P. 831-841.

163. Cao, S. Source identification of pollution and health risks to metals in household indoor and outdoor dust: A cross-sectional study in a typical mining town, China / S. Cao, D. Wen, X. Chen et al. // *Environmental Pollution*. – 2022. – Vol. 293. – P. 118551.

164. Carvalho, C.F. Environmental manganese exposure and associations with memory, executive functions, and hyperactivity in Brazilian children / C.F. Carvalho, Y. Oulhote, M. Martorelli et al. // *Neurotoxicology*. – 2018. – № 69. – P. 253-259.

165. Cen, C. Protective effects of *Coridius chinensis* extracts on rat reproductive damage induced by manganese / C. Cen, F. Wang, K. Xiong // *Andrologia*. – 2022. – Vol. 54. – № 2. – P. 14326.

166. Cendrowska-Pinkosz, M. The effect of the use of copper carbonate and

copper nanoparticles in the diet of rats on the level of  $\beta$ -amyloid and acetylcholinesterase in selected organs / M. Cendrowska-Pinkosz, M. Krauze, J. Juśkiewicz et al. // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. – 2021. – Vol. 67. – P. 126777.

167. Chandel, M. Manganese induced hematological alteration in Wistar rats / M. Chandel, G. Jain // *Journal of Environmental and Occupational Science*. – 2016. – Vol. 5. – № 4. – P. 77 -81.

168. Chandra, S.V. Manganese-induced behavioral dysfunction and its neurochemical mechanism in growing mice / S.V. Chandra, G.S. Shukla, D.K. Saxena // *Journal of Neurochemistry*. – 1979. – № 33. – P. 1217-1221.

169. Chao, H-H. Comprehensive review on the positive and negative effects of various important regulators on male spermatogenesis and fertility / H-H. Chao, Y. Zhang, P-Y. Dong et al. // *Front. Nutr.* – 2023. – № 9. – P. 1063510.

170. Chen, P. Manganese metabolism in humans / P. Chen, J. Bornhorst, M. Aschner // *Frontiers in Bioscience*. – 2018. – Vol. 23. – P. 1655-1679.

171. Chen, Y.H. Zinc as a Signal to Stimulate Red Blood Cell Formation in Fish / Y.H. Chen, J.R Shiu, C.L. Ho et al. // *Int J Mol Sci*. – 2017. – Vol. 18. – № 1. – P. 138.

172. Cheung, J. Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands / J. Cheung, M.J. Rudolph, F. Burshteyn et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2012. – Vol. 55. – № 22. – P. 10282-10286.

173. Chtourou, Y. Improvement of cerebellum redox states and cholinergic functions contribute to the beneficial effects of silymarin against manganese-induced neurotoxicity / Y. Chtourou, H. Fetoui, el M. Garoui et al. // *Neurochem Res*. – 2012. – Vol. 37. – № 3. – P. 469-479.

174. Claus Henn, B. Maternal and Cord Blood Manganese Concentrations and Early Childhood Neurodevelopment among Residents near a Mining-Impacted Superfund Site / B. Claus Henn, D.C. Bellinger, M.R. Hopkins et al. // *Environmental health perspectives*. – 2017. – Vol. 125. – № 6. – P. 067020.

175. Clemente, G.S. Arginase as a Potential Biomarker of Disease Progression: A Molecular Imaging Perspective / G.S. Clemente, A. van Waarde, I.F. Antunes et al. //

International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21. – № 15. – P. 5291.

176. Conley, T.E. Early postnatal manganese exposure causes arousal dysregulation and lasting hypofunctioning of the prefrontal cortex catecholaminergic systems / T.E. Conley, S.A. Beaudin, S.M. Lasley et al. // Journal of neurochemistry. – 2020. – Vol. 153. – № 5. – P. 631-649.

177. Coussons-Read, M.E. Effects of prenatal stress on pregnancy and human development: mechanisms and pathways / M.E. Coussons-Read // Obstet Med. – 2013. – Vol. 6. – № 2. – P. 52-57.

178. Criswell, S.R. Principal Component Analysis of Striatal and Extrastriatal D2 Dopamine Receptor Positron Emission Tomography in Manganese-Exposed Workers / S.R. Criswell, S. Searles Nielsen, W.W. Dlamini et al. // Toxicological Sciences. – 2021. – Vol. 182. – № 1. – P. 132-141.

179. Crossgrove, J. Manganese toxicity upon overexposure / J. Crossgrove, W. Zheng // NMR in Biomedicine. – 2004. – Vol. 17. – № 8. – P. 544-553.

180. Dai, Y. Cord Blood Manganese Concentrations in Relation to Birth Outcomes and Childhood Physical Growth: A Prospective Birth Cohort Study / Y. Dai, J. Zhang, X. Qi // Nutrients. – 2021. – Vol. 13. – № 12. – P. 4304.

181. Dashevskii, V.Y. Utilization of Manganese in Russian Metallurgy / V.Y. Dashevskii, V.I. Zhuchkov, L.I. Leontev // Steel in Translation. – 2019. – Vol. 49. – № 1. – P. 50-57.

182. Dastych, M. Manganese and copper levels in patients with primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis / M. Dastych, L. Husová, K. Aiglová et al. // Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. – 2021. – Vol. 81. – № 2. – P. 116-120.

183. Diederich, J. Manganese and iron species in Sprague–Dawley rats exposed with  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  (i.v.) / J. Diederich, M. Brielmeier, T. Schwerdtle et al. // Microchemical Journal. – 2012. – Vol. 105 – P. 115-123.

184. Dlamini, W.W. Manganese exposure, parkinsonian signs, and quality of life in South African mine workers / W.W. Dlamini, G. Nelson, S.S. Nielsen et al. // Am J Ind Med. – 2020. – Vol. 63. – № 1. – P. 36-43.

185. Dolsey, E.A. Trace substance in environmental health / E.A. Dolsey. University of Missouri-Columbia, 1972. – 199 p.

186. Dominiak, A. Selenium in the Therapy of Neurological Diseases. Where is it Going? / A. Dominiak, A. Wilkaniec, P. Wroczyński et al. // *Curr Neuropharmacol.* – 2016. – Vol. 14. – № 3. – P. 282-299.

187. Dorman, D.C. Neurotoxicity of manganese chloride in neonatal and adult CD rats following subchronic (21-day) high-dose oral exposure / D.C. Dorman, M.F. Struve, D. Vitarella et al. // *Journal of Applied Toxicology.* – 2000. – № 20. – P. 179-187.

188. Dorman, D.C. Update on a pharmacokinetic-centric Alternative Tier II program for MMT-Part I: Program implementation and lessons learned / D.C. Dorman, M.E. Andersen, J.M. Roper et al. // *J. Toxicol.* – 2012. – P. 946742.

189. Du, K. Association of Circulating Magnesium Levels in Patients With Alzheimer's Disease From 1991 to 2021: A Systematic Review and Meta-Analysis / K. Du, X. Zheng, Z. Ma et al. // *Frontiers in aging neuroscience.* – 2022. – № 13. – P. 799824.

190. Dutta, S. Effect of pesticide exposure on the cholinesterase activity of the occupationally exposed tea garden workers of northern part of West Bengal, India / S. Dutta, M. Bahadur // *Biomarkers.* – 2019. – Vol. 24. – № 4. – P. 317-324.

191. Eid, T. Roles of glutamine synthetase inhibition in epilepsy / T. Eid, K. Behar, R. Dhaher et al. // *Neurochemical Research.* – 2012. – Vol. 37. – № 11. – P. 2339-2350.

192. El-Hady, W.M. Neurotoxic Outcomes of Subchronic Manganese Chloride Exposure via Contaminated Water in Adult Male Rats and the Potential Benefits of Ebselen / W.M. El-Hady, A.A.A. Galal // *Biol Trace Elem Res.* – 2018. – Vol. 186. – № 1. – P. 208-217.

193. Ensunsa, J.L. Reducing arginase activity via dietary manganese deficiency enhances endothelium-dependent vasorelaxation of rat aorta / J.L. Ensunsa, J.D. Symons, L. Lanoue et al. // *Experimental Biology and Medicine.* – 2004. – Vol. 229. – № 11. – P. 1143-1153.

194. Erikson, K.M. Manganese accumulates in iron-deficient rat brain regions in a heterogeneous fashion and is associated with neurochemical alterations / K.M. Erikson, Z.K. Shihabi, J.L. Aschner et al. // *Biol Trace Elem Res.* – 2002. – Vol. 87. – № 1-3. – P.143-156.

195. Erikson, K.M. Manganese: Its Role in Disease and Health // K.M. Erikson, M. Aschner // *Met Ions Life Sci.* – 2019. – P. 253-266.

196. Eum, J.H. Maternal blood manganese level and birth weight: a MOCEH birth cohort study / J.H. Eum, H.K. Cheong, E.H. Ha et al. // *Environ Health.* 2014. – Vol. 13. – № 1. – P. 31.

197. Fan, X.M. Chronic Manganese Administration with Longer Intervals Between Injections Produced Neurotoxicity and Hepatotoxicity in Rats / Fan X.M., Y. Luo, Y.M. Cao et al. // *Neurochem Res.* – 2020. – Vol. 45. – № 8. – P. 1941-1952.

198. Fernández-Olmo, I. Environmental Exposure to Airborne Manganese, Biomonitoring, and Neurological/Neuropsychological Outcomes / I. Fernández-Olmo, P. Mantecón, B. Markiv et al. // *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.* – 2021. – Vol. 254. – P. 85-130.

199. Ferreira, S.A. Environmentally relevant manganese concentrations evoke anxiety phenotypes in adult zebrafish / S.A. Ferreira, J.S. Loreto, M.M. Dos Santos et al. // *Environ Toxicol Pharmacol.* – 2022. – № 93. – P. 103870.

200. Firth, J. *Oxford Textbook of Medicine* / J. Firth, C. Conlon, T. Cox. – Oxford: Oxford University Press, 2020. – 7728 p.

201. Frame, A.K. Simple Protocol for Distinguishing Drug-induced Effects on Spatial Memory Acquisition, Consolidation and Retrieval in Mice Using the Morris Water Maze / A.K. Frame, A. Lone, R.A. Harris, R.C. Cumming // *Bio Protoc.* – 2019. – Vol. 9. – № 18. – P. 3376.

202. Freeland-Graves, J.H. International variability in diet and requirements of manganese: causes and consequences / J.H. Freeland-Graves, T.Y. Mousa, S. Kim // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* – 2016. – Vol. 38. – P. 24-32.

203. Frisbie, S.H. Manganese levels in infant formula and young child nutritional beverages in the United States and France: Comparison to breast milk and regulations /

S.H. Frisbie, E.J. Mitchell, S. Roudeau et al. // *PLoS One*. – 2019. – Vol. 14. – № 11. – P. e0223636.

204. Fujishiro, H. Roles of ZIP8, ZIP14, and DMT1 in transport of cadmium and manganese in mouse kidney proximal tubule cells / H. Fujishiro, Y. Yano, Y. Takada et al. // *Metallomics*. – 2012. – Vol. 4. – № 7. – P.700-708.

205. Gaidamakova, E.K. Small-Molecule Mn Antioxidants in *Caenorhabditis elegans* and *Deinococcus radiodurans* Supplant MnSOD Enzymes during Aging and Irradiation / E.K. Gaidamakova, A. Sharma, V.Y. Matrosova et al. // *mBio*. – 2022. – Vol. 13. – № 1. – P. e0339421.

206. Gandhi, D. The impact of environmental and occupational exposures of manganese on pulmonary, hepatic, and renal functions / D. Gandhi, A.P. Rudrashetti, S. Rajasekaran // *Journal of Applied Toxicology*. – 2022. – V. 42. – № 1. – P.103-129.

207. Garcia, S.J. A manganese-enhanced diet alters brain metals and transporters in the developing rat / S.J. Garcia, K. Gellein, T. Syversen et al. // *Toxicological Sciences*. – 2006. – Vol. 92. – № 2. – P. 516-525.

208. Garcia, S.J. Iron deficient and manganese supplemented diets alter metals and transporters in the developing rat brain / S.J. Garcia, K. Gellein, T. Syversen et al. // *Toxicological Sciences*. – 2007. – Vol. 95. – № 1. – P. 205-214.

209. García-Ayllón, M.S. Altered levels of acetylcholinesterase in Alzheimer plasma / M.S. García-Ayllón, I. Riba-Llena, C. Serra-Basante et al. // *PLoS One*. – 2010. – Vol. 5. – № 1. – P. e8701.

210. Gernand, A.D. Micronutrient deficiencies in pregnancy worldwide: health effects and prevention / A.D. Gernand, K.J. Schulze, C.P. Stewart et al. // *Nat Rev Endocrinol*. – 2016. – Vol. 12. – № 5. – P. 274-289.

211. Ghasemi, M. Nitric Oxide and Mitochondrial Function in Neurological Diseases / M. Ghasemi, Y. Mayasi, A. Hannoun et al. // *Neuroscience*. – 2018. – Vol. 376. – P. 48-71.

212. Ghosh, S.K. Diversity in the Family of Manganese Oxides at the Nanoscale: From Fundamentals to Applications / S.K. Ghosh // *ACS Omega*. – 2020. – Vol. 5. – № 40. – P. 25493-25504.

213. Glorennec, P. French children's exposure to metals via ingestion of indoor dust, outdoor playground dust and soil: contamination data / P. Glorennec, J.P. Lucas, C. Mandin et al. // *Environ Int.* – 2012. – № 45. – P. 129-34.

214. Gonzalez-Casanova, I. Prenatal exposure to environmental pollutants and child development trajectories through 7 years / I. Gonzalez-Casanova, A.D. Stein, A. Barraza-Villarreal et al. // *International journal of hygiene and environmental health.* – 2018. – Vol. 221. – № 4. – P. 616-622.

215. Grochowski, C. Analysis of Trace Elements in Human Brain: Its Aim, Methods, and Concentration Levels / C. Grochowski, E. Blicharska, P. Krukow et al. // *Frontiers in chemistry.* – 2019. – № 7. – P. 115.

216. Gromadzka, G. Copper Dyshomeostasis in Neurodegenerative Diseases-Therapeutic Implications / G. Gromadzka, B. Tarnacka, A. Flaga et al. // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21. – № 23. – P. 9259.

217. Grygo-Szymanko, E. Speciation analysis and fractionation of manganese: A review / E. Grygo-Szymanko, A. Tobiasz, S. Walas // *Trends in Analytical Chemistry.* – 2016. – № 80. – P. 112-124.

218. Gunier, R.B. Determinants of manganese levels in house dust samples from the CHAMACOS cohort / R.B. Gunier, M. Jerrett, D.R. Smith et al. // *The Science of the total environment.* – 2014. – P. 360-368.

219. Gunter, T.E. Manganese transport via the transferrin mechanism / T.E. Gunter, B. Gerstner, K.K. Gunter et al. // *Neurotoxicology.* – 2013. – № 34. – P.118-127.

220. Guo, Z. Manganese chloride induces histone acetylation changes in neuronal cells: its role in manganese-induced damage / Z. Guo, Z. Zhang, Q. Wang et al. // *Neurotoxicology.* – 2018. – Vol. 65. – P. 255-263.

221. Gurol, K.C. Role of excretion in manganese homeostasis and neurotoxicity: a historical perspective / K.C. Gurol, M. Aschner, D.R. Smith et al. // *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology.* – 2022. – Vol. 322. – № 1. – P. 79-92.

222. Hagemeyer, S. Prospects of Zinc Supplementation in Autism Spectrum

Disorders and Shankopathies Such as Phelan McDermid Syndrome / S. Hagemeyer, A.K. Sauer, A.M. Grabrucker // *Front Synaptic Neurosci.* – 2018. – № 10. – P. 11.

223. Han, S.H. Blood acetylcholinesterase level is a potential biomarker for the early detection of cerebral amyloid deposition in cognitively normal individuals / S.H. Han, J.C Park, M.S. Byun et al. // *Neurobiology of Aging.* – 2019. – № 73. – P. 21-29.

224. Hartman, S. Prenatal Stress as a Risk-and an Opportunity-Factor / S. Hartman, S.M. Freeman, K.L. Bales et al. // *Psychol Sci.* – 2018. – Vol. 29. – № 4. – P. 572-580.

225. Hannibal, L. Nitric Oxide Homeostasis in Neurodegenerative Diseases / L. Hannibal // *Current Alzheimer Research.* – 2016. – Vol. 13. – № 2. – P. 135-149.

226. Henn, B.C. Maternal and Cord Blood Manganese Concentrations and Early Childhood Neurodevelopment Among Residents Near a Mining-Impacted Superfund Site / B.C. Henn, D.C. Bellinger, M.R. Hopkins et al. // *Environ. Health Perspect.* – 2017. – Vol. 125. – № 6. – P. 335-342.

227. Hidalgo, J. A Unique Case of Pyruvate Carboxylase Deficiency / J. Hidalgo, L. Campoverde, J.F. Ortiz et al. // *Cureus.* – 2021. – Vol. 13. – № 5. – P. e15042.

228. Hill, D.S. Autism-Like Behavior and Epigenetic Changes Associated with Autism as Consequences of In Utero Exposure to Environmental Pollutants in a Mouse Model / D.S. Hill, R. Cabrera, D. Wallis Schultz et al. // *Behav Neurol.* – 2015. – № 2015. – P. 426263.

229. Holtkamp, D.E. The effect on growth of the level of manganese in the diet of rats, with some observations on the manganese-thiamine relationship / D.E. Holtkamp, R.M. Hill // *J. Nutr.* – 1950. – № 41. – P. 307-316.

230. Horning, K.J. Manganese Is Essential for Neuronal Health / K.J. Horning, S.W. Caito, K.G. Tipps et al. // *Annual Review of Nutrition.* – 2015. – Vol. 35. – P. 71-108.

231. Hu, J. Critical Windows for Associations between Manganese Exposure during Pregnancy and Size at Birth: A Longitudinal Cohort Study in Wuhan, China /



J. Hu, C. Wu, T. Zheng et al. // *Environmental Health Perspectives*. – 2018. – Vol. 126. – № 12. – P.127006.

232. Hussein, M.A. Some hematological and biochemical effects of potassium permanganate (KMnO<sub>4</sub>) on female mice (*Mus musculus*L.) / M.A. Hussein, F.S. Kata // *J Basrah Res Sci*. – 2008. – № 34. – P. 9-13.

233. Ijomone, O.M. Epigenetic influence of environmentally neurotoxic metals / O.M. Ijomone, O.K. Ijomone, J.D. Iroegbu et al. // *Neurotoxicology*. – 2020. – Vol. 81. – P. 51-65.

234. Ismail, H.T.H. Hematobiochemical Disturbances and Oxidative Stress After Subacute Manganese Chloride Exposure and Potential Protective Effects of Ebselen in Rats / H.T.H. Ismail // *Biol Trace Elem Res*. – 2019. – Vol. 187. – № 2. – P. 452-463.

235. Jayakumar, A.R. Glutamine Synthetase: Role in Neurological Disorders / A.R. Jayakumar, M.D. Norenberg // *Advances in Neurobiology*. – 2016. – Vol. 13. – P. 327-350.

236. Joshi, P. Huntington's disease associated resistance to Mn neurotoxicity is neurodevelopmental stage and neuronal lineage dependent / P. Joshi, C. Bodnya, I. Ilieva et al. // *Neurotoxicology*. – 2019. – № 75. – P. 148-157.

237. Jursa, T. Ceruloplasmin Alters the Tissue Disposition and Neurotoxicity of Manganese, but not its Loading onto Transferrin / T. Jursa, D.R. Smith // *Toxicological Sciences* – 2009. – Vol. 107. – № 1. – P. 182-193.

238. Kemmerer, A.R. Studies on the relation of manganese to the nutrition of the mouse / A.R. Kemmerer, C. A. Elvehjem, E.B. Hart // *J. Biol. Chem*. – 1931. – Vol. 92. – № 3. – P. 623-630.

239. Kern, C.H. Prewaning manganese exposure causes hyperactivity, disinhibition, and spatial learning and memory deficits associated with altered dopamine receptor and transporter levels / C.H. Kern, G.D. Stanwood, D.R. Smith // *Synapse*. – 2010. – Vol. 64. – № 5. – P. 363-378.

240. Kim, D.W. Association between Pb, Cd, and Hg Exposure and Liver Injury among Korean Adults / D.W. Kim, J. Ock, K.W. Moon et al. // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2021. – Vol. 18. – № 13. – P. 6783.

241. Kim, J. Iron and mechanisms of emotional behavior / J. Kim, M. Wessling-Resnick // *J. Nutritional. Biochem.* – 2014. – № 25. – P. 1101-1107.

242. Kim, Y.  $\mu$ Sex, pregnancy, and age-specific differences of blood manganese levels in relation to iron status; what does it mean? / Y. Kim // *Toxicology Reports.* – 2017. – № 5. – P. 28-30.

243. Kim, K. Dietary minerals, reproductive hormone levels and sporadic anovulation: Associations in healthy women with regular menstrual cycles / K. Kim, J. Wactawski-Wende, K.A. Michels et al. // *J. Nutr.* – 2018. – Vol. 120. – № 1. – P. 81-89.

244. Kimura, M. Function and disease in manganese / M. Kimura // *Nihon Rinsho.* – 2016. – Vol. 74. – № 7. – P. 1186-1191.

245. Klein, L.D. Concentrations of trace elements in human milk: Comparisons among women in Argentina, Namibia, Poland, and the United States / L.D. Klein, A.A. Breakey, B. Scelza et al. // *Plos One.* 2017. – Vol. 12. – № 8. – P. E0183367.

246. Kornblith, E.S. Environmental exposure to manganese in air: Tremor, motor and cognitive symptom profiles // S.L. Casey, D.T. Lobdell, M.A. Colledge et al. // *Neurotoxicology.* – 2018. – Vol. 64. – P. 152-158.

247. Kretsinger, R.H. *Encyclopedia of Metalloproteins* / R.H. Kretsinger, V.N. Uversky, E.A. Permyakov. – New York: Springer Science and Business Media, 2013. – 2631 p.

248. Kupferschmid, B.J. Effects of low-dose lipopolysaccharide and age on spatial learning in different Morris water maze protocols / B.J. Kupferschmid, B. Therrien, P.J. Rowsey // *SAGE Open Med.* – 2017. – № 5.

249. Langeh, U. Targeting S100B Protein as a Surrogate Biomarker and its Role in Various Neurological Disorders / U. Langeh, S. Singh // *Curr Neuropharmacol.* – 2021. – Vol. 19. – № 2. – P. 265-277.

250. Lazrshvili, I.L. Morphological changes and manganese content in the brains of rat pups subjected to subchronic poisoning with manganese chloride / I.L. Lazrshvili, A.A. Shukakidze, N.N. Chkhartishvili et al. // *Neurosci Behav Physiol.* – 2009. – Vol. 39. – № 1. – P. 7-12.

251. Li, G.J. Molecular mechanism of distorted iron regulation in the blood-CSF barrier and regional blood-brain barrier following in vivo subchronic manganese exposure / G.J. Li, B.S. Choi, X. Wang et al. // *Neurotoxicology*. – 2006. – Vol. 27. – № 5. – P. 737-744.

252. Li, L. The Essential Element Manganese, Oxidative Stress, and Metabolic Diseases: Links and Interactions / L. Li, X. Yang // *Oxid Med Cell Longev*. – 2018. – Vol. 2018. – P. 7580707.

253. Li, Y.V. Metal Ion in Stroke / Y.V. Li, J.H. Zhang. – New York: Springer Science and Business Media, 2012. – 810 p.

254. Lin, M. Mechanism of Manganese Dysregulation of Dopamine Neuronal Activity / M. Lin, L.M. Colon-Perez, D.O. Sambo et al. // *The Journal of Neuroscience*. – 2020. – Vol. 40. – № 30. – P. 5871-5891.

255. Lindner, S. Genetics and Epigenetics of Manganese Toxicity / S. Lindner, R. Lucchini, K. Broberg // *Curr Environ Health Rep*. – 2022. – Vol. 9. – № 4. – P. 697-713.

256. Lionetto, M.G. Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives / M.G. Lionetto, R. Caricato, A. Calisi et al. // *BioMed Research International*. – 2013. – P. 321213.

257. Liu, Q. Iron and manganese transport in mammalian systems / Q. Liu, S. Barker, M.D. Knutson // *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. – 2021. – Vol. 1868. – № 1. – P. 118890.

258. Liu, X. Recent Advances of Manganese-Based Hybrid Nanomaterials for Cancer Precision Medicine / X. Liu, P. Rong // *Frontiers in Oncology*. – 2021. – Vol. 11. – P. 707618.

259. Ljubisavljevic, S. Modulation of nitric oxide synthase by arginase and methylated arginines during the acute phase of experimental multiple sclerosis / S. Ljubisavljevic, I. Stojanovic, R. Pavlovic et al. // *J Neurol Sci*. – 2012. – Vol. 318. – № 1-2. – P. 106-111.

260. Lopotych, N. Influence of heavy metals on hematologic parameters, body weight gain and organ weight in rats / N. Lopotych, N. Panas, T. Datsko et al. //

Ukrainian Journal of Ecology. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 175-179.

261. Lotz, A. Association of exposure to manganese and fine motor skills in welders - Results from the WELDOX II study / A. Lotz, B. Pesch, S. Casjens et al. // *Neurotoxicology*. – 2021. – № 82. – P. 137-145.

262. Lucchini, R. Manganese and Developmental Neurotoxicity / R. Lucchini, D. Placidi, G. Cagna et al. // *Advances in neurobiology*. – 2017. – № 18. – P.13-34.

263. Luo, X. High manganese exposure decreased the risk of high triglycerides in workers: a cross-sectional study / X. Luo, Z. Liu, X. Ge // *BMC Public Health*. – 2020. – Vol. 20. – № 1. – P. 874.

264. Lv, M. Manganese is critical for antitumor immune responses via cGAS-STING and improves the efficacy of clinical immunotherapy / M. Lv, M. Chen, R. Zhang et al. // *Cell Research*. – 2020. – Vol. 30. – № 11. – P. 966-979.

265. Maciejewski, R. An Overview of Essential Microelements and Common Metallic Nanoparticles and Their Effects on Male Fertility / R. Maciejewski, E. Radzikowska-Büchner, W. Flieger et al. // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. – 2022. – № 19. – P. 11066.

266. Malik, V. Structural, functional, and mutagenesis studies of UDP-glycosyltransferases / V. Malik, G.W. Black // *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. – 2012. – Vol. 87. – P. 87-115.

267. Martin, K.V. Manganese Exposure and Neurologic Outcomes in Adult Populations / K.V. Martin, D. Edmondson, K.M. Cecil et al. // *Clinical Neurology and Neurosurgery*. – 2020. – Vol. 38. – № 4. – P. 913-936.

268. Martinez-Zamudio, R. Environmental epigenetics in metal exposure / R. Martinez-Zamudio, H.C. Ha // *Epigenetics*. – 2011. – Vol. 6. – № 7. – P. 820-827.

269. Martins, A.C. *Caenorhabditis elegans* as a Model to Study Manganese-Induced Neurotoxicity / A.C. Martins, P. Gubert, J. Li et al. // *Biomolecules*. – 2022. – Vol. 12. – № 10. – P. 1396.

270. Martins, A.C.Jr. Manganese-induced neurodegenerative diseases and possible therapeutic approaches / A.C.Jr. Martins, P. Gubert, G.R. Villas Boas et al. //

Expert Review of Neurotherapeutics. – 2020. – Vol. 20. – № 11. – P. 1109-1121.

271. Martins, A.C.Jr. New Insights on the Role of Manganese in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease / A.C.Jr. Martins, P. Morcillo, O.M. Ijomone et al. // International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2019. – Vol.16. – № 19. – P. 3546.

272. Matyal, R. Oxidative Stress and Nerve Function After Cardiopulmonary Bypass in Patients With Diabetes / R. Matyal, S. Sakamuri, T. Huang et al. // The Annals of Thoracic Surgery. – 2014. – Vol. 98. – № 5. – P.1635-1644.

273. Mehrifar, Y. The effects of occupational exposure to manganese fume on neurobehavioral and neurocognitive functions: An analytical cross-sectional study among welders / Y. Mehrifar, M. Bahrami, E. Sidabadi et al. // EXCLI Journal. – 2020. – № 19. – P. 372-386.

274. Mercadante, C.J. The effect of high dose oral manganese exposure on copper, iron and zinc levels in rats / C.J. Mercadante, C. Herrera, M.A. Pettiglio et al. // Biometals. – 2016. – Vol. 29. – № 3. – P. 417-422.

275. Mezzaroba, L. The role of zinc, copper, manganese and iron in neurodegenerative diseases / L. Mezzaroba, D.F. Alfieri, A.N. Colado Simão et al. // Neurotoxicology. – 2019. – № 74. – P. 230-241.

276. Miah, M.R. The effects of manganese overexposure on brain health / M.R. Miah, O.M. Ijomone, C.O.A. Okoh et al. // Neurochem Int. – 2020. – № 135. – P. 104688.

277. Michalke, B. An approach for manganese biomonitoring using a manganese carrier switch in serum from transferrin to citrate at slightly elevated manganese concentration / B. Michalke, L. Aslanoglou, M. Ochsenkuhn-Petropoulou et al. // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. – 2015. – Vol. 32. – P. 145-154.

278. Michalke, B. Manganese speciation in paired serum and CSF samples using SEC-DRC-ICP-MS and CE-ICP-DRC-MS / B. Michalke, M. Lucio, A. Berthele et al. // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2013. – Vol. 405. – P. 2301-2309.

279. Michalke, B. Manganese species from human serum, cerebrospinal fluid analyzed by size exclusion chromatography-, capillary electrophoresis coupled to

inductively coupled plasma mass spectrometry / B. Michalke, A. Berthele, P. Mistriotis et al. // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. – 2007. – Vol. 21. – P. 4-9.

280. Michalke, B. New insights into manganese toxicity and speciation / B. Michalke, K. Fernsebner // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. – 2014. – Vol. 28. – № 2. – P. 106-116.

281. Michalke, B. Review about Powerful Combinations of Advanced and Hyphenated Sample Introduction Techniques with Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) for Elucidating Trace Element Species in Pathologic Conditions on a Molecular Level / B. Michalke // *Int J Mol Sci*. – 2022. – Vol. 23. – № 11. – P. 6109.

282. Michetti, F. The S100B story: from biomarker to active factor in neural injury / Michetti, F., N. D'Ambrosi, A. Toesca et al. // *J Neurochem*. – 2019. – Vol. 148. – № 2. – P. 168-187.

283. Migliaccio, O. Maternal Exposure to Cadmium and Manganese Impairs Reproduction and Progeny Fitness in the Sea Urchin *Paracentrotus lividus* / O. Migliaccio, I. Castellano, P. Cirino et al. // *PLoS ONE*. – 2015.

284. Molina, R.M. Ingestion of Mn and Pb by rats during and after pregnancy alters iron metabolism and behavior in offspring / R.M. Molina, S. Phattanarudee, J. Kim et al. // *Neurotoxicology*. – 2011. – Vol. 32. – № 4. – P. 413-422.

285. Moon, M.K. Lead, mercury, and cadmium exposures are associated with obesity but not with diabetes mellitus: Korean National Environmental Health Survey (KoNEHS) 2015-2017 / M.K. Moon, I. Lee, A. Lee et al. // *Environmental Research*. – 2022. – Vol. 204. – P. 111888.

286. Moreno, J.A. Age-dependent susceptibility to manganese-induced neurological dysfunction / J.A. Moreno, Yeomans E.C., Streifel K.M. et al. // *Toxicol Sci*. – 2009. – Vol. 112. – № 2. – P. 394-404.

287. Mousavi, Z. Effects of Subcutaneous Injection MnO<sub>2</sub> Micro- and Nanoparticles on Blood Glucose Level and Lipid Profile in Rat / Z. Mousavi, M. Hassanpourezatti, P. Najafizadeh et al. // *Iran J Med Sci*. – 2016. – Vol. 41. – № 6. –

P. 518-524.

288. Murcko, R. Diagnostic biomarker kinetics: how brain-derived biomarkers distribute through the human body, and how this affects their diagnostic significance: the case of S100B / R. Murcko, N. Marchi, D. Bailey et al. // *Fluids Barriers CNS*. – 2022. – Vol. 19. – № 1. – P. 32.

289. Nakamura, T. Nitric Oxide-Dependent Protein Post-Translational Modifications Impair Mitochondrial Function and Metabolism to Contribute to Neurodegenerative Diseases / T. Nakamura, S.A. Lipton // *Antioxidants and Redox Signaling*. – 2020. – Vol. 32. – № 12. – P. 817-833.

290. Nandakumaran, M. Maternal-fetal transport kinetics of manganese in perfused human placental lobule in vitro / M. Nandakumaran, B. Al-Sannan, H. Al-Sarraf et al. // *J. Matern. Neonatal Med.* – 2016. – Vol. 29. – № 1. – P. 274-278.

291. Neth, K. Diverse Serum Manganese Species Affect Brain Metabolites Depending on Exposure Conditions / K. Neth, M. Lucio, A. Walker et al. // *Chemical Research in Toxicology*. – 2015. – Vol. 28. – № 7. – P. 1434-1442.

292. Nkpaa, K.W. Ethanol exacerbates manganese - induced functional alterations along the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of male rats / K.W. Nkpaa, B.A. Amadi, I.A. Adedara et al. // *Neurosci Lett*. – 2018. – Vol. 684. – № 1. – P. 47-54.

293. Notova, S.V. Speciation analysis of manganese against the background of its different content in the blood serum of dairy cows / S.V. Notova, S.V. Lebedev, O.V. Marshinskaia et al. // *Biometals*. – 2022. – Vol. 36. – № 1. – P. 35-48.

294. Nriagu, J. *Encyclopedia of Environmental Health* / J. Nriagu. – Oxford: Elsevier, 2019. – 4884 p.

295. Nyarko-Danquah, I. Manganese Accumulation in the Brain via Various Transporters and Its Neurotoxicity Mechanisms / I. Nyarko-Danquah, E. Pajarillo, A. Digman, et al. // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – № 24. – P. 5880.

296. Ogino, K. Association of serum arginase I with oxidative stress in a healthy population / K. Ogino, N. Takahashi, T. Takigawa et al. // *Free Radic Res*. – 2011. – Vol. 45. – № 2. – P. 147-155.

297. Okada, M.A. Brain effects of manganese exposure in mice pups during prenatal and breastfeeding periods / M.A Okada, F.F Neto, C.H. Noso et al. // *Neurochemistry International*. – 2016. – Vol. 97. – № 2016. – P.109-116.

298. Oliveira, D.C. A review of select minerals influencing the haematopoietic process / D.C. Oliveira, A. Nogueira-Pedro, E.W. Santos et al. // *Nutr Res Rev*. – 2018. – Vol. 31. – № 2. – P. 267-280.

299. O'Neal, S.L. Manganese Toxicity Upon Overexposure: a Decade in Review / S.L. O'Neal, W. Zheng // *Current environmental health reports*. – 2015. – Vol. 2. – № 3. – P. 315-328.

300. Oshiro, W.M. Impacts of a perinatal exposure to manganese coupled with maternal stress in rats: Learning, memory and attentional function in exposed offspring / W.M. Oshiro, K.L. McDaniel, T.E. Beasley et al. // *Neurotoxicol Teratol*. – 2022. – № 91. – P. 107077.

301. Palma, F.R. Mitochondrial Superoxide Dismutase: What the Established, the Intriguing, and the Novel Reveal About a Key Cellular Redox Switch / F.R. Palma, C. He, J.M. Danes et al. // *Antioxidants and Redox Signaling*. – 2020. – V. 32. – № 10. – P. 701-714.

302. Papageorgiou, I.E. Astrocytic glutamine synthetase is expressed in the neuronal somatic layers and down-regulated proportionally to neuronal loss in the human epileptic hippocampus / I.E. Papageorgiou, N.A. Valous, B. Lahrmann et al. // *Glia*. – 2018. – Vol. 66. – № 5. – P. 920-933.

303. Pappas, B.A. Perinatal manganese exposure: behavioral, neurochemical, and histopathological effects in the rat / B.A. Pappas, D. Zhang, C.M. Davidson // *Neurotoxicology and Teratology*. – 1997. – Vol. 19. – № 1. – P. 17-25.

304. Park, J. Human farnesyl pyrophosphate synthase is allosterically inhibited by its own product / J. Park, M. Zielinski, A. Magder et al. // *Nature Communications*. – 2017. – Vol. 8. – P. 14132.

305. Peres, T.V. Developmental exposure to manganese induces lasting motor and cognitive impairment in rats / T.V. Peres, H. Eyng, S.C. Lopes et al. // *Neurotoxicology*. – 2015. – № 50. – P. 28-37.



306. Peres, T.V. Manganese-induced neurotoxicity: a review of its behavioral consequences and neuroprotective strategies / T.V. Peres, M.R. Schettinger, P. Chen et al. // *BMC Pharmacology and Toxicology*. – 2016. – Vol. 17. – № 1. – P. 57.

307. Pizzino, G. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health / G. Pizzino, N. Irrera, M. Cucinotta et al. // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2017. – Vol. 2017. – P. 8416763.

308. Polis, B. Arginase Inhibition Supports Survival and Differentiation of Neuronal Precursors in Adult Alzheimer's Disease Mice / B. Polis, K.D. Srikanth, V. Gurevich et al. // *Int J Mol Sci*. – 2020. – Vol. 21. – № 3. – P. 1133.

309. Polis, B. L-Norvaline Reverses Cognitive Decline and Synaptic Loss in a Murine Model of Alzheimer's Disease // B. Polis, Srikanth K.D., E. Elliott et al. // *Neurotherapeutics*. – 2018. – Vol. 15. – № 4. – P. 1036-1054.

310. Qi, H.Z. Antioxidative system of *Deinococcus radiodurans* / H.Z. Qi, W.Z. Wang, J.Y. He et al. // *Research in Microbiology*. – 2020. – Vol. 171. – № 2. – P. 45-54.

311. Racette, B.A. Dose-dependent progression of parkinsonism in manganese-exposed welders / B.A. Racette, S. Searles Nielsen, S.R. Criswell et al. // *Neurology*. – 2017. – Vol. 88. – № 4. – P. 344-351.

312. Rager, J.E. Review of the environmental prenatal exposome and its relationship to maternal and fetal health / J.E. Rager, J. Bangma, C. Carberry et al. // *Reproductive Toxicology*. – 2020. – № 98. – P.1-12.

313. Rasmussen Loft, A.G. Amniotic fluid acetylcholinesterase in the prenatal diagnosis of open neural tube defects and abdominal wall defects: a comparison of gel electrophoresis and a monoclonal antibody immunoassay / A.G. Rasmussen Loft, K. Nanchahal, H.S. Cuckle et al. // *Prenatal Diagnosis Journal*. – 1990. – Vol. 10. – № 7. – P. 449-459.

314. Rehnberg, G.L. Chronic ingestion of Mn304 by rats: Tissue accumulation and distribution of manganese in two generations / G.L. Rehnberg, J.F. Hein, S.D. Carter et al. // *J. Toxicol. Environ. Health*. – 1982. – № 9. – P. 175-188.

315. Rieck, J. Unique Chemistry, Intake, and Metabolism of Polyamines in the

Central Nervous System (CNS) and Its Body / J. Rieck, S.N. Skatchkov, C. Derst et al. // *Biomolecules*. – 2022. – Vol. 12. – № 4. – P. 501.

316. Rodríguez-Rodríguez, E. An inadequate intake of manganese may favour insulin resistance in girls / E. Rodríguez-Rodríguez, L.M. Bermejo, A.M. López-Sobaler et al. // *Nutr Hosp*. – 2011. – Vol. 26. – № 5. – P. 965-970.

317. Rodrigues, J.L.G. Manganese and lead levels in settled dust in elementary schools are correlated with biomarkers of exposure in school-aged children / J.L.G. Rodrigues, M.J. Bandeira, C.F.S. Araújo, N.R. Dos Santos et al. // *Environmental Pollution*. – 2018. – Vol. 236. – P.1004-1013.

318. Rondanelli, M. Essentiality of Manganese for Bone Health: An Overview and Update / M. Rondanelli, M.A. Faliva, G. Peroni et al. // *Natural Product Communications*. – 2021.

319. Rotundo, R.L. Assembly and regulation of acetylcholinesterase at the vertebrate neuromuscular junctions / R.L. Rotundo, C.A. Ruiz, E. Marrero et al. // *Chemico-Biological Interactions*. – 2008. – Vol. 175. – № 1-3. – P. 26-29.

320. Ruiz-Azcona, L. Impact of Environmental Airborne Manganese Exposure on Cognitive and Motor Functions in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis / L. Ruiz-Azcona, I. Fernández-Olmo, A. Expósito et al. // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2021. – Vol. 18. – № 8. – P. 4075.

321. Santos, D. The inhibitory effect of manganese on acetylcholinesterase activity enhances oxidative stress and neuroinflammation in the rat brain / D. Santos, D. Milatovic, V. Andrade et al. // *Toxicology*. – 2012. – Vol. 292. – № 2-3. – P. 90-98.

322. Scher, D.P. Potential for Manganese-Induced Neurologic Harm to Formula-Fed Infants: A Risk Assessment of Total Oral Exposure / D.P. Scher, H.M. Goeden, K.S. Klos // *Environmental Health Perspectives*. – 2021. – Vol. 129. – № 4. – P. 47011.

323. Schetinger, M.R.C. Combined exposure to methylmercury and manganese during L1 larval stage causes motor dysfunction, cholinergic and monoaminergic up-regulation and oxidative stress in L4 *Caenorhabditis elegans* / M.R.C. Schetinger, T.V. Peres, L.P. Arantes et al. // *Toxicology*. – 2019. – Vol. 411. – P. 154-162.

324. Scheuhammer, A.M. 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 / A.M. Scheuhammer, M.G. Cherian // *J Toxicol Environ Health.* – 1983. – Vol. 12. – № 2-3. – P. 361-370.

325. Schousboe, A. Astrocytic pyruvate carboxylation: Status after 35 years / A. Schousboe, H.S. Waagepetersen, U. Sonnewald // *Journal of Neuroscience Research.* – 2019. – 97. – № 8. – P. 890-896.

326. Sengupta, P. The laboratory rat: relating its age with human's / P. Sengupta // *Int. J. Prev. Med.* – 2013. – Vol. 4. – № 6. – P. 624-630.

327. Sengupta, P. Metals and female reproductive toxicity / P. Sengupta, R. Banerjee, S. Nath et al. // *Hum Exp Toxicol.* – 2015. – Vol. 34. – № 7. – P. 679-97.

328. Seo, Y.A. Ferroportin deficiency impairs manganese metabolism in flatiron mice / Y.A. Seo, M. Wessling-Resnick // *The FASEB Journal.* – 2015. – Vol. 29. – № 7. – P. 2726-3273.

329. Severin, A. Ecological and physiological assessment of adaptation processes of nonresident students to the anthropogenic conditions of Moscow / A. Severin, Y. Majorova, V. Shevtsov, K. Isaev, D. Efremova, B. Laver, S. Alam // *E3S Web of Conferences.* – 2021. – Vol. 265. – № 25. – P. 06004.

330. Sewberath Misser, V.H. Prenatal Exposure to Mercury, Manganese, and Lead and Adverse Birth Outcomes in Suriname: A Population-Based Birth Cohort Study / V.H. Sewberath Misser, A.D. Hindori-Mohangoo, A. Shankar et al. // *Toxics.* – 2022. – № 10. – P. 464.

331. Sharma, A. Manganese nanoparticles induce blood-brain barrier disruption, cerebral blood flow reduction, edema formation and brain pathology associated with cognitive and motor dysfunctions / A. Sharma, L. Feng, D.F. Muresanu et al. // *Prog Brain Res.* – 2021. – № 265. – P. 385-406.

332. Sharma, J. Effect of manganese on haematological parameters of fish, *Garra gotyla gotyla* / J. Sharma, S. Langer // *J Entomol Zool Stud.* – 2014. – № 2. – P. 77-81.

333. Shi, T. Heavy metals in indoor dust: Spatial distribution, influencing factors, and potential health risks / T. Shi, Y. Wang // *Science of the Total Environment.* – 2021. – Vol. 755. – P. 142367.

334. Skalnaya, M.G. Association between semen quality and level of 20 essential and toxic metals in ejaculate / M.G. Skalnaya, E.P. Serebryansky, V.V. Yurasov et al. // Trace Elem. Electrolytes. – 2015. – № 32. – P. 126-132.

335. Smethurst, D.G.J. Interchangeable utilization of metals: New perspectives on the impacts of metal ions employed in ancient and extant biomolecules / D.G.J. Smethurst, N. Shcherbik // Journal of Biological Chemistry. – 2021. – Vol. 297. – № 6. – P.101374.

336. Smith, E.A. Increased whole blood manganese concentrations observed in children with iron deficiency anaemia / E.A. Smith, P. Newland, K.G. Bestwick et al. // J Trace Elem Med Biol. – 2013. – Vol. 27. – № 1. – P. 65-69.

337. Smith, M.R. Redox dynamics of manganese as a mitochondrial life-death switch / M.R. Smith, J. Fernandes, Y.M. Go et al. // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2017. – Vol. 482. – № 3 – P. 388-398.

338. Smyth, L.T. Clinical manganism and exposure to manganese in the production and processing of ferromanganese alloy / L.T. Smyth, R.C. Ruhf, N.E. Whitman et al. // J Occup Med. – 1973. – Vol. 15. – № 2. – P. 101-109.

339. Soares, A.T.G. The impact of manganese on neurotransmitter systems / A.T.G. Soares, A.C. Silva, A.A. Tinkov et al. // J Trace Elem Med Biol. – 2020. – № 61. – P. 126554.

340. Soler-Blasco, R. Prenatal manganese exposure and neuropsychological development in early childhood in the INMA cohort / R. Soler-Blasco, M. Murcia, M. Lozano et al. // International Journal of Hygiene and Environmental Health. – 2020. – Vol. 224. – P. 113443.

341. Souza, T.L. Multigenerational analysis of the functional status of male reproductive system in mice after exposure to realistic doses of manganese / T.L. Souza, A.R. Batschauer, Brito P.M. et al. // Food Chem Toxicol. – 2019. – № 133. – P. 110763.

342. Souza, T.L. Evaluation of Mn exposure in the male reproductive system and its relationship with reproductive dysfunction in mice / T.L. Souza, A.R. Batschauer, P.M. Brito et al. // Toxicology. – 2020. – Vol. 441. – № 1. – P. 152504.

343. Studer, J.M. Functions of manganese in reproduction / J.M. Studer, W.P. Schweer, N.K. Gabler et al. // *Animal Reproduction Science*. – 2022. – Vol. 238. – P. 106924.

344. Sun, Y. Manganese induced nervous injury by  $\alpha$ -synuclein accumulation via ATP-sensitive K(+) channels and GABA receptors / Y. Sun, Y. He, L. Yang et al. // *Toxicology Letters*. – 2020. – Vol. 332. – P. 164-170.

345. Sun, Z. The Link between Trace Metal Elements and Glucose Metabolism: Evidence from Zinc, Copper, Iron, and Manganese-Mediated Metabolic Regulation / Z. Sun, Y. Shao, K. Yan et al. // *Metabolites*. – 2023. – Vol. 13. – № 10. – P. 1048.

346. Szentmihályi, K. Diabetes and trace elements / K. Szentmihályi, S. Klébert, A. Somogyi // *Orv Hetil*. – 2022. – Vol. 163. – № 33. – P. 1303-1310.

347. Tan, S.Y. A review of heavy metals in indoor dust and its human health-risk implications / S.Y. Tan, S.M. Praveena, E.Z. Abidin et al. // *Reviews on Environmental Health*. – 2016. – Vol. 31. – № 4. – P. 447-456.

348. Taouk, L. Transgenerational transmission of pregestational and prenatal experience: maternal adversity, enrichment, and underlying epigenetic and environmental mechanisms / L. Taouk, J. Schulkin // *J Dev Orig Health Dis*. – 2016. – Vol. 7. – № 6. – P. 588-601.

349. Tarale, P. Potential Role of Epigenetic Mechanism in Manganese Induced Neurotoxicity / P. Tarale, T. Chakrabarti, S. Sivanesan et al. // *Biomed Res Int*. – 2016. – Vol. 2016. – P. 2548792.

350. Tarrant, J. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering / J. Tarrant // *Comprehensive Medicinal Chemistry III / Emerging Translatable Safety Biomarkers*. – 2017. – P. 255-284.

351. Taylor, C.A. Maintaining Translational Relevance in Animal Models of Manganese Neurotoxicity // C.A. Taylor, K. Tuschl, M.M. Nicolai et al. // *J Nutr*. – 2020. – Vol. 150. – № 6. – P. 1360-1369.

352. Tinggi, U. Selenium Status: Its Interactions with Dietary Mercury Exposure and Implications in Human Health / U. Tinggi, A.V. Perkins // *Nutrients*. – 2022. – Vol. 14. – № 24. – P. 5308.

353. Tran, T.T. Effect of high dietary manganese intake of neonatal rats on tissue mineral accumulation, striatal dopamine levels, and neurodevelopmental status / T.T. Tran, W. Chowanadisai, F.M. Crinella et al. // *Neurotoxicology*. – 2002. – Vol. 23. – № 4-5. – P. 635-643.

354. Tricarico, P.M. Mevalonate Pathway Blockade, Mitochondrial Dysfunction and Autophagy: A Possible Link / P.M. Tricarico, S. Crovella, F. Celsi // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2015. – Vol.16. – № 7. – P. 16067-16084.

355. Tomlinson, G. Activation and inactivation of acetylcholinesterase by metal ions. / G. Tomlinson, B. Mutus, I. McLennan // *Can J Biochem*. – 1981. – Vol. 59. – № 9. – P. 728-735.

356. Tuschl, K. Mutations in SLC39A14 disrupt manganese homeostasis and cause childhood-onset parkinsonism-dystonia / K. Tuschl, E. Meyer, L.E. Valdivia et al. // *Nature communications*. – 2016. – № 7. – P. 11601.

357. Underwood, E.G. Trace elements in human and animal nutrition / E.G. Underwood. 4rd ed. Acad. Press. New York, 1977. – 402 p.

358. van de Poll, M.C. Elevated plasma arginase-1 does not affect plasma arginine in patients undergoing liver resection / M.C. van de Poll, S.J. Hanssen, M. Berbée et al. // *Clin Sci*. – 2008. – Vol. 114. – № 3. – P. 231-241.

359. Verhoog, Q.P. Astrocytes as Guardians of Neuronal Excitability: Mechanisms Underlying Epileptogenesis / Q.P. Verhoog, L. Holtman, E. Aronica et al. // *Frontiers in Neurology*. – 2020. – Vol. 26. – № 11. – P. 591690.

360. Vigeh, M. Blood manganese concentrations and intrauterine growth restriction / M. Vigeh, K. Yokoyama, F. Ramezanzadeh et al. // *Reprod Toxicol*. – 2008. – Vol. 25. – № 2. – P. 219-223.

361. Vorhees, C.V. Effects of developmental manganese, stress, and the combination of both on monoamines, growth, and corticosterone / C.V. Vorhees, D.L. Graham, R.M. Amos-Kroohs et al. // *Toxicology Reports*. – 2014. – № 1. – P. 1046-1061.

362. Wang, H. UHPLC-Q-TOF/MS based plasma metabolomics reveals the metabolic perturbations by manganese exposure in rat models / H. Wang, Z. Liu,

S. Wang et al. // *Metallomics*. – 2017. – Vol. 9. – № 2. – P. 192-203.

363. Wang, X. Efflux of iron from the cerebrospinal fluid to the blood at the blood-CSF barrier: effect of manganese exposure / X. Wang, G.J. Li, W. Zheng // *Exp Biol Med (Maywood)*. – 2008. – Vol. 233. – № 12. – P.1561-1571.

364. Ward, R.J. Essential Metals in Medicine: Therapeutic Use and Toxicity of Metal Ions in the Clinic / R.J. Ward, R.R. Crichton // *Metal. Ions Life Sci.* – 2019. – № 19. – P. 87-122.

365. Winslow, J.W.W. The Functions of ZIP8, ZIP14, and ZnT10 in the Regulation of Systemic Manganese Homeostasis / J.W.W. Winslow, K.H. Limesand, N. Zhao // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 9. – P. 3304.

366. Xie, J. Effects of inorganic and organic manganese supplementation on gonadotropin-releasing hormone-I and follicle-stimulating hormone expression and reproductive performance of broiler breeder hens / J. Xie, C. Tian, Y. Zhu et al. // *Poult. Sci.* – 2014. – № 93. – P. 959-969.

367. Xue, W. The Effect of Magnesium Deficiency on Neurological Disorders: A Narrative Review Article / W. Xue, J. You, Y. Su et al. // *Iran J Public Health*. – 2019. – Vol. 48. – № 3. – P. 379-387.

368. Yamamoto, M. Association between blood manganese level during pregnancy and birth size: The Japan environment and children's study (JECS) / M. Yamamoto, K. Sakurai, A. Eguchi et al. // *Environmental Research*. – 2019. – Vol. 172. – P. 117-126.

369. Yang, H. Occupational manganese exposure, reproductive hormones, and semen quality in male workers: A cross-sectional study / H. Yang, J. Wang, X. Yang et al. // *Toxicology and Industrial Health*. – 2019. – Vol. 35. – № 1. – P. 53-62.

370. Ye, Q. Influence of iron metabolism on manganese transport and toxicity / Q. Ye, J.E. Park, K. Gugnani et al. // *Metallomics*. – 2017. – Vol. 9. – № 8. – P.1028-1046.

371. Yokel, R.A. Manganese toxicokinetics at the blood-brain barrier / R.A. Yokel, J.S. Crossgrove // *Res. Rep. Health Eff. Inst.* – 2004. – № 119. – P. 7-58.

372. Yoon, M. Assessing children's exposure to manganese in drinking water using a PBPK model / M. Yoon, C. Ring, C.B. Van Landingham et al. // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2019. – № 380. – P. 114695.

373. Yu, X.D. Prenatal exposure to manganese at environment relevant level and neonatal neurobehavioral development / X.D. Yu, J. Zhang, C.H. Yan et al. // *Environ Res*. – 2014. – № 133. – P. 232-238.

374. Zhang, D. Toxicity of manganese exposure on the postnatal development of brain in mice / D. Zhang, X. He, S. Huang et al. // *Journal of hygiene research*. – 2002. – Vol. 31. – № 2. – P. 73-75.

375. Zhou, B. Dietary intake of manganese and the risk of the metabolic syndrome in a Chinese population / B. Zhou, X. Su, D. Su, et al. // *J Nutr*. – 2016. – Vol. 116. – № 5. – P. 853-863.

376. Zhu, X. Liver Function of Male Rats Exposed to Manganese at Different Time Points / X. Zhu, L. Yang, Y. He et al. // *Biol Trace Elem Res*. – 2020. – Vol. 198. – № 1. – P. 224-230.

377. Zhuchkov, V.I. Situation and Development of Ferroalloy Metallurgy in Russia / V.I. Zhuchkov, L.I. Leontiev, V.Y. Dashevsky // *KnE Materials Science*. – 2019. – P. 1-14.

378. Zoroddu, M.A. The essential metals for humans: a brief overview / M.A. Zoroddu, J. Aaseth, G. Crisponi et al. // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 2019. – Vol. 195. – P. 120-129.

379. Zota, A.R. Associations between metals in residential environmental media and exposure biomarkers over time in infants living near a mining-impacted site / A.R. Zota, A.M. Riederer, A.S. Ettinger, L.A. Schaidler et al. // *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*. – 2016. – Vol. 26. – № 5. – P. 510-519.

380. Zwolak, I. The Role of Selenium in Arsenic and Cadmium Toxicity: an Updated Review of Scientific Literature / I. Zwolak // *Biol Trace Elem Res*. – 2020. – Vol. 193. – № 1. – P. 44-63.



## Приложение А (справочное)

### Химический состав полнорационного корма и бутилированной воды

Таблица А.1 – Состав полнорационного корма по данным производителя

Показатель	Содержание
Витамин А, МЕ	15300
Витамин Д3, МЕ	1700
Витамин Е, МЕ	102
Витамин К3, г/кг	0,0056
Витамин В1, г/кг	0,0337
Витамин В2, г/кг	0,0225
Никотиновая кислота, г/кг	0,0337
Пантотеновая кислота, г/кг	0,09
Витамин В6, г/кг	0,0168
Витамин В12, г/кг	0,00006
Витамин Н, г/кг	0,00004
Витамин В9, г/кг	0,0045
Витамин С, г/кг	0,0787
Витамин В4, г/кг	1,125
Марганец, г/кг	0,0637
Цинк, г/кг	0,0602
Железо, г/кг	0,1125
Медь, г/кг	0,101
Йод, г/кг	0,000112
Кобальт, г/кг	0,000151
Селен, г/кг	0,00007
Магний, г/кг	0,225
Энергетическая ценность, ккал/кг	2700
Сырая протеин, %	20
Сырая клетчатка, %	5,8
Лизин, %	1,0
Метионин + цистин, %	0,6
Кальций, %	0,9
Фосфор, %	0,6
Натрия хлорид, %	0,6
Антиоксидант	введен
Аминокислоты, %	введены
Состав	пшеница, ячмень, отруби, соя полножирная, мука рыбная, дрожжи кормовые, шрот соевый, жмых подсолнечный, масло подсолнечное

Таблица А.2 – Состав бутилированной питьевой воды по данным производителя

<b>Показатели</b>	<b>Бутилированная питьевая вода</b>
рН	7,1-7,4
Жесткость, мг-экв/л	6
Общая минерализация, г/л	0,1-0,5
Сульфаты, мг/л	100
Хлориды, мг/л	150
Гидрокарбонаты, мг/л	300
К, мг/л	20
Са, мг/л	80
Mg, мг/л	30
Mn, мг/л	<0,001

Таблица А.3 – Содержание марганца в кормах животных согласно данным анализа, проведенного в аккредитованной лаборатории

<b>Показатели</b>	<b>Контрольный рацион</b>	<b>Опытный рацион</b>
Mn, мг/кг	57,84± 13,6	361,24±27,3

**Приложение Б**  
(обязательное)

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

**№ 2794816**

**Способ моделирования энцефалопатии у потомства при  
воздействии нетоксичных доз марганца в пренатальный  
период**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
"Оренбургский государственный университет" (RU)*

Авторы: *Нотова Светлана Викторовна (RU), Казакова  
Татьяна Витальевна (RU), Маршинская Ольга  
Владимировна (RU)*

Заявка № **2022123583**

Приоритет изобретения **05 сентября 2022 г.**

Дата государственной регистрации  
в Государственном реестре изобретений  
Российской Федерации **25 апреля 2023 г.**

Срок действия исключительного права  
на изобретение истекает **05 сентября 2042 г.**

*Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности*

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ  
Сертификат 68b80077e14e410a94e6bd24145d5c7  
Владелец **Зубов Юрий Сергеевич**  
Действителен с 24.05.2022 по 26.05.2023

*Ю.С. Зубов*



## Приложение В (справочное)

### Оценка изменения внешних признаков и степени активности лабораторных животных

Таблица В.1 – Шкала изменений внешних признаков крыс

Признак	Баллы и символы	Описание изменения
Окрас	1 /+/ 2 /++/	Тусклый Яркий
	1 /+/ 2 /++/ 3 /+++/	Выпадение шерсти Загрязненный Не загрязненный

Таблица В.2 – Шкала изменений активности крыс

Баллы и символы	Степень активности	Описание активности
0	-	Погибшее животное
1 /+/ 2 /++/	Кома (отсутствие активности) Слабая (минимальная)	Боковое положение, отсутствие активных движений, мышцы расслаблены, дыхание прерывисто, реакции на болевые и тактильные раздражители, в том числе и голосовые, практически отсутствуют. В основном – боковое положение, непроизвольные слабые активные движения, мышцы расслаблены, вялая реакция на болевые и тактильные раздражители.
3 /+++/ 4 /++++/	Пассивная Замедленная (субнормальная)	Животное заторможено, активно по клетке не передвигается, но при подталкивании перемещается на несколько шагов. Положение естественное – на четырех лапах; ощущается тонус мышц. «Избегательная» защитная реакция на раздражители, голосовая реакция слабая. Положение – на четырех лапах, медленные активные движения – повороты туловища и небольшие передвижения по клетке, редкие глотательные движения. Реакция на болевые и тактильные раздражители – голосовая и «избегательно-оборонительная» с попытками укусов. При фиксации рукой за кожу в области спины - изворачивается с «уходом» от экспериментатора.
5 /+++++/	Нормальная	Подвижна; активные движения – перемещение и «изыскание лучшего места в группе»; «настороженно-ожидательная» поза при незначительных болевых и тактильных раздражителях с избеганием, резкой голосовой и активно-оборонительными реакциями, царапающими и кусательными движениями.

189  
**Приложение Г**  
**(обязательное)**

Таблица Г.1 – Показатели (Ме (Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub>)) валового содержания химических элементов в сыворотке крови животных на фоне воздействия марганца, мкг/мл

Элемент	Группы					
	Контроль (самки)	Опыт (самки)	Контроль I (потомство)	Опыт I (потомство)	Контроль II (потомство)	Опыт II (потомство)
<b>Макроэлементы</b>						
Ca	126,0 (124,4-130,6)	116,0 (111,0-117,9) <sup>aa</sup>	111,1 (110,0-115,1)	99,0 (97,0-101,2)	118,3 (117,8-119,6)	118,6 (117,0-119,7)
P	207,2 (193,1-214,6)	168,1 (159,0-179,0)	222,9 (220,8-225,0)	214,2 (201,0-223,9) <sup>c</sup>	195,6 (184,4-205,0)	192,4 (190,0-193,6)
K	597,4 (593,6-620,3)	450,5 (353,8-472,0) <sup>aa</sup>	579,4 (560,9-618,9)	403,9 (323,0-424,0) <sup>b</sup>	385,2 (352,0-415,2)	351,5 (348,0-357,0)
Na	3320,0 (3197,0-3641,0)	3488,0 (3254,0-3641,0)	3120,0 (2932,5-3310,5)	3111,0 (2905,0-3292,0)	2547,0 (2245,0-2999,0)	2735,0 (2453,0-3019,0)
Mg	29,5 (29,0-29,6)	23,8 (22,5-24,1) <sup>a</sup>	29,4 (28,7-29,5)	24,0 (23,1-24,5) <sup>b</sup>	29,6 (28,7-30,4)	27,2 (25,8-28,9)
<b>Жизненно необходимые микроэлементы</b>						
Fe	5,07 (5,01-5,15)	4,54 (3,75-4,86) <sup>a</sup>	6,41 (5,84-7,8)	3,9 (3,7-4,16) <sup>bb, ee</sup>	5,53 (5,02-6,41)	5,26 (5,2-5,37)
Zn	1,57 (1,52-1,64)	1,46 (1,41-1,47)	1,63 (1,62-1,66)	1,09 (0,99-1,17) <sup>bb, ee</sup>	1,67 (1,52-1,75)	1,35 (1,33-1,38) <sup>c, d, f</sup>
Cu	2,12 (1,82-2,22)	1,62 (1,57-1,7) <sup>aa</sup>	1,32 (1,07-1,39)	1,06 (1,03-1,12) <sup>ee</sup>	1,47 (1,41-1,53)	1,34 (0,96-1,62) <sup>dd, f</sup>
Mn	0,0064 (0,005-0,007)	0,0109 (0,0082-0,0122) <sup>aa</sup>	0,008 (0,007-0,0087)	0,0089 (0,067-0,0108) <sup>b</sup>	0,005 (0,0048-0,0053)	0,0055 (0,005-0,007)
Co	0,00065 (0,00058-0,00072)	0,00062 (0,00055-0,00069)	0,00055 (0,00049-0,00067)	0,00065 (0,00053-0,00072)	0,00056 (0,00052-0,00063)	0,00057 (0,00049-0,00068)
Cr	0,0214 (0,0202-0,0225)	0,0208 (0,0202-0,0218)	0,0220 (0,0210-0,0228)	0,0216 (0,0211-0,0232)	0,0224 (0,0200-0,0257)	0,0236 (0,0221-0,0245)
Se	0,354 (0,317-0,427)	0,441 (0,388-0,526)	0,374 (0,37-0,375)	0,428 (0,419-0,432) <sup>c</sup>	0,494 (0,48-0,528)	0,519 (0,5-0,526)
I	0,048 (0,04-0,056)	0,063 (0,05-0,086)	0,058 (0,054-0,06)	0,099 (0,088-0,13)	0,036 (0,028-0,042)	0,048 (0,041-0,058) <sup>dd, ff</sup>
<b>Условно жизненно необходимые микроэлементы</b>						
Ni	0,0107 (0,0104-0,0110)	0,0114 (0,0102-0,0117)	0,0121 (0,0119-0,0134)	0,0121 (0,0118-0,0127)	0,0118 (0,0115-0,0125)	0,0122 (0,0117-0,0132)
V	0,006 (0,005-0,007)	0,007 (0,006-0,008)	0,006 (0,005-0,007)	0,008 (0,006-0,009)	0,006 (0,005-0,007)	0,006 (0,005-0,007)
As	0,0032 (0,0031-0,0043)	0,0034 (0,0031-0,0044)	0,0026 (0,0023-0,0028)	0,0027 (0,0023-0,0038)	0,0037 (0,0029-0,0044)	0,0033 (0,0031-0,0034)
<b>Токсичные микроэлементы</b>						
Pb	0,0023 (0,0014-0,0036)	0,0021 (0,0016-0,0032)	0,0017 (0,0012-0,0019)	0,0019 (0,0014-0,0022)	0,0014 (0,0011-0,0015)	0,0016 (0,0011-0,0019)
Cd	0,00027 (0,00015-0,00038)	0,00025 (0,00019-0,00041)	0,00013 (0,00011-0,00014)	0,00016 (0,00014-0,00017)	0,00013 (0,00011-0,00016)	0,00011 (0,00009-0,00013)
Hg	0,00052 (0,00031-0,00062)	0,00048 (0,00037-0,00052)	0,00046 (0,00042-0,00053)	0,00042 (0,00035-0,00048)	0,00049 (0,00038-0,00052)	0,00044 (0,00035-0,00056)
Sn	0,00025 (0,00024-0,00026)	0,00024 (0,00023-0,00032)	0,00024 (0,00021-0,00029)	0,00026 (0,00021-0,00034)	0,00027 (0,00024-0,00035)	0,00022 (0,00019-0,00029)
Sr	0,087 (0,084-0,089)	0,108 (0,08-0,119)	0,102 (0,0766-0,115)	0,135 (0,133-0,138)	0,116 (0,112-0,121)	0,125 (0,105-0,133)
<p>Примечание – a – (p≤0,05); aa – (p≤0,01) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп самок; b – (p≤0,05); bb – (p≤0,01) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп потомства I; c – (p≤0,05) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп потомства II; d – (p≤0,05), dd – (p≤0,01) – p-уровень при сравнении опытной группы II (потомство) с опытной группой I (потомство); e – (p≤0,05), ee – (p≤0,01) – p-уровень при сравнении опытной группы I (потомство) с опытной группой (самки); f – (p≤0,05); ff – (p≤0,01) – p-уровень при сравнении опытной группы II (потомство) с опытной группой (самки).</p>						

## Приложение Д (обязательное)

Таблица Д.1 – Показатели (Ме (Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub>)) валового содержания химических элементов в коре головного мозга лабораторных животных на фоне воздействия марганца, мкг/г

Элемент	Группы					
	Контроль (самки)	Опыт (самки)	Контроль I (потомство)	Опыт I (потомство)	Контроль II (потомство)	Опыт II (потомство)
<b>Макроэлементы</b>						
Ca	86,7 (68,2-92,5)	75,1 (59,4-80,1)	56,5 (49,1-60,4)	58,8 (56,6-67,5)	52,5 (51,3-55,2)	87,5 (63,6-94,3)
P	4519,5 (4365,0-4541,0)	4270,9 (4224,0-4341,5)	4396,5 (4039,8-4604,4)	3883,5 (3664,9-4141,6)	4138,1 (4057,0-4649,9)	4247,9 (4031,0-4435,6)
K	4837,7 (4742,3-4864,2)	4618,7 (4270,0-4645,4)	4344,6 (4177,5-4570,2)	4192,1 (4183,1-4212,2)	4344,2 (4322,5-4431,9)	4769,9 (4712,5-4868,6) <sup>dd</sup>
Na	1042,5 (1035,6-1046,6)	981,0 (977,0-981,4)	825,0 (796,3-866,2)	798,0 (777,8-841,7)	809,7 (794,9-859,8)	963,1 (940,8-980,5) <sup>dd</sup>
Mg	168,2 (159,1-173,4)	159,3 (158,2-167,1)	136,1 (126,2-145,9)	119,3 (118,4-121,0) <sup>bb, c</sup>	133,6 (114,6-148,2)	139,8 (125,4-149,9) <sup>d, ff</sup>
<b>Жизненно необходимые микроэлементы</b>						
Fe	35,0 (21,8-40,1)	23,9 (22,2-35,8) <sup>a</sup>	36,2 (28,2-46,4)	16,8 (15,2-20,5) <sup>bb, ee</sup>	26,7 (16,2-37,1)	20,7 (20,3-21,2) <sup>c, f</sup>
Zn	16,5 (15,3-17,6)	15,0 (14,6-15,5)	13,6 (13,3-14,0)	12,5 (12,4-12,6) <sup>ee</sup>	12,6 (11,1-14,2)	13,2 (13,0-13,7)
Cu	2,52 (2,23-3,17)	2,39 (2,29-2,5)	1,99 (1,94-2,05)	1,98 (1,87-2,04)	1,97 (1,78-2,04)	2,11 (1,91-2,24)
Mn	0,44 (0,388-0,492)	0,525 (0,52-0,56) <sup>aa</sup>	0,448 (0,423-0,468)	0,686 (0,576-0,699) <sup>bb</sup>	0,427 (0,423-0,43)	0,496 (0,491-0,502) <sup>ff</sup>
Co	0,0054 (0,0043-0,0069)	0,0061 (0,0051-0,007)	0,0054 (0,0049-0,0059)	0,0038 (0,0029-0,004) <sup>b, ee</sup>	0,0043 (0,004-0,0048)	0,0034 (0,0026-0,0052)
Cr	0,039 (0,034-0,055)	0,035 (0,031-0,04)	0,04 (0,038-0,05)	0,029 (0,02-0,055)	0,04 (0,025-0,053)	0,03 (0,027-0,039)
Se	0,147 (0,13-0,212)	0,14 (0,138-0,16)	0,186 (0,155-0,193)	0,144 (0,139-0,154) <sup>b</sup>	0,139 (0,133-0,158)	0,175 (0,162-0,196) <sup>dd</sup>
I	0,144 (0,132-0,16)	0,058 (0,05-0,071) <sup>a</sup>	0,193 (0,176-0,207)	0,2 (0,159-0,234) <sup>ee</sup>	0,131 (0,12-0,157)	0,148 (0,137-0,159)
<b>Условно жизненно необходимые микроэлементы</b>						
Ni	0,023 (0,02-0,03)	0,025 (0,022-0,03)	0,023 (0,007-0,034)	0,008 (0,006-0,012)	0,019 (0,013-0,024)	0,019 (0,016-0,02)
V	0,0015 (0,0012-0,0019)	0,0020 (0,0018-0,0021)	0,0014 (0,0007-0,0022)	0,0013 (0,0008-0,0022)	0,0022 (0,0021-0,0027)	0,0028 (0,0026-0,0030)
As	0,056 (0,052-0,06)	0,046 (0,044-0,06)	0,037 (0,022-0,048)	0,028 (0,021-0,03) <sup>ee</sup>	0,02 (0,012-0,021)	0,026 (0,022-0,029) <sup>ff</sup>
<b>Токсичные микроэлементы</b>						
Pb	0,0093 (0,0088-0,0099)	0,023 (0,02-0,029) <sup>aa</sup>	0,0055 (0,005-0,006)	0,0086 (0,0082-0,0098) <sup>ee</sup>	0,006 (0,0058-0,0063)	0,004 (0,0039-0,0057) <sup>dd</sup>
Cd	0,00053 (0,00047-0,00058)	0,00054 (0,00051-0,00059)	0,00065 (0,00057-0,00071)	0,00064 (0,00058-0,00069)	0,0005 (0,00047-0,00058)	0,00058 (0,00049-0,00062)
Hg	0,0038 (0,0037-0,004)	0,0069 (0,0062-0,008) <sup>a</sup>	0,0037 (0,0036-0,0039)	0,0036 (0,0032-0,0038) <sup>ee</sup>	0,0038 (0,0036-0,0046)	0,0037 (0,0032-0,0048) <sup>ff</sup>
Sn	0,0085 (0,0082-0,0092)	0,0095 (0,0090-0,0100)	0,0069 (0,0062-0,0071)	0,0064 (0,0061-0,0073)	0,0074 (0,0067-0,0078)	0,0081 (0,0073-0,0090)
Sr	0,254 (0,21-0,276)	0,398 (0,356-0,448) <sup>aa</sup>	0,194 (0,19-0,199)	0,228 (0,192-0,248) <sup>c</sup>	0,226 (0,165-0,311)	0,264 (0,137-0,294) <sup>ff</sup>

Примечание – a – (p≤0,05); aa – (p≤0,01) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп самок; b – (p≤0,05); bb – (p≤0,01) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп потомства I; c – (p≤0,05) – p-уровень при сравнении опытной и контрольной групп потомства II; d – (p≤0,05), dd – (p≤0,01) – p-уровень при сравнении опытной группы II (потомство) с опытной группой I (потомство); e – (p≤0,05), ee – (p≤0,01) – p-уровень при сравнении опытной группы I (потомство) с опытной группой (самки); f – (p≤0,05); ff – (p≤0,01) – p-уровень при сравнении опытной группы II (потомство) с опытной группой (самки).