

БИОХИМИЯ

УДК 612.015.31
DOI: 10.26456/vtbio331

СОСТОЯНИЕ ЭЛЕМЕНТНОГО ГОМЕОСТАЗА НА ФОНЕ СУБХРОНИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ МАРГАНЦА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)*

Т.В. Казакова, О.В. Маршинская, С.В. Нотова
Федеральный научный центр биологических систем
и агротехнологий РАН, Оренбург

Наравне с профессиональным воздействием Mn увеличивается риск хронического влияния относительно низких концентраций данного металла на все население в целом. Известно, 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. В связи с этим, целью исследования явилось изучить уровни жизненно необходимых микроэлементов в сыворотке крови и выявить особенности распределения Mn по его металл-лигандным формам в экспериментальной модели субхронического перорального воздействия данного металла. Для проведения исследования было отобрано 20 половозрелых крыс, из которых были сформированы две группы: контрольная (n=10) и опытная (n=10). Животные контрольной группы получали основной рацион, животные опытной группы – диету с дополнительным введением $MnSO_4 \times 5H_2O$ в дозе 1433 мг/кг в течение 28 дней. По окончании эксперимента осуществлялся забор крови для определения содержания микроэлементов в сыворотке крови методом ИСП-МС и металл-лигандных форм Mn методом ВЭЖХ-ИСП-МС. Установлено, что субхроническое пероральное поступление Mn приводило к увеличению его концентрации в сыворотке крови в 1,7 ($p \leq 0,01$) раз относительно контрольных значений на фоне снижения содержания Fe и Cu в 1,2 ($p \leq 0,05$) и 1,3 ($p \leq 0,01$) раза, соответственно. На фоне повышения валового содержания Mn происходило смещение уровней марганцевых фракций в сторону низкомолекулярных форм. Выявленные изменения могут служить прогностическим инструментом, характеризующим неблагоприятное действие субхронического воздействия Mn.

Ключевые слова: марганец, токсичность, *speciation*-анализ, комплексообразование, металл-лигандные формы, масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой.

* Исследования проводились в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН (FNWZ-2022-0011).

Введение. Несмотря на то, что марганец (Mn) является эссенциальным микроэлементом, необходимым для нормального функционирования различных физиологических процессов, включая метаболизм аминокислот, липидов, белков и углеводов, его избыточное экзогенное воздействие может вызвать системные нарушения в организме человека и животных. При этом независимо от пути поступления, токсичное действие Mn в основном проявляется в нарушении работы центральной нервной системы (Скальный и Рудаков, 2004; Радыш и др., 2017; Оберлис и др., 2018; Jomova et al., 2022).

Важно отметить, что наравне с профессиональным воздействием Mn увеличивается риск хронического влияния относительно низких концентраций данного металла на все население в целом. Это подтверждается данными экологического мониторинга, в ходе которого было установлено превышение предельно допустимых концентраций Mn в атмосферном воздухе, почвах, а также в питьевой и хозяйственно-бытовой воде во многих регионах Российской Федерации (РФ) (Черногаева и др., 2022). Помимо этого, по данным комплексного обследования, было также зарегистрировано повышенное содержание Mn в волосах жителей различных половозрастных групп в ряде федеральных округов РФ (Скальный и др., 2011a, 2012b, 2013c, 2014d; Корчина и др., 2018a, 2018b). В настоящее время предполагается, что воздействие Mn в течение жизни может привести к субклиническим неврологическим нарушениям и стать возможным фактором риска возникновения нейродегенеративных заболеваний (Martin et al., 2020). Согласно эпидемиологическим исследованиям зарубежных ученых, распространенность экстрапирамидных расстройств была выше в районах, расположенных вблизи промышленных объектов, использующих в рабочем цикле Mn (Ruiz-Azcona et al., 2021). В связи с этим, в последние десятилетия ученые стали обращать особое внимание на изучение последствий хронического низкоуровневого воздействия Mn на организм человека и животных, а также вести поиск донозологических изменений, как ранних предикторов развития заболеваний со стороны центральной нервной системы с целью повышения эффективности диагностических и профилактических мероприятий (Shilnikova et al., 2022).

Известно, 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. В этой связи особую актуальность приобретает изучение минерального обмена на фоне хронического воздействия Mn. Однако, как показывает практика, определение

валового содержания элементов в различных биообразцах не всегда позволяет дать точную оценку состоянию минерального обмена, тогда как для полной характеристики поведения химического элемента в функциональной системе требуется определение его связанности в комплексы с органическими и неорганическими лигандами (Айсувакова, 2018). В этой связи одним из перспективных направлений приобретает анализ отдельных химических форм металлов (*speciation analysis*), представляющий собой количественное определение металл-лигандных фракций, в виде которых элементы присутствуют в биологическом материале (сыворотка крови, спинномозговая жидкость и др.) (Michalke, 2003). Данный анализ может расширить оценку элементного гомеостаза организма, и, возможно, позволит выявить, новые инструменты донозологической диагностики.

Целью работы явилось изучить уровни жизненно необходимых микроэлементов и выявить особенности распределения Mn по его металл-лигандным формам в экспериментальной модели субхронического перорального воздействия данного металла.

Методика. Исследования были проведены в экспериментально-биологической клинике (виварий) ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук» (г. Оренбург). Эксперимент выполнен на модели крыс линии «Wistar» в соответствии с протоколами Женевской конвенции и принципами надлежащей лабораторной практики (Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики»), 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 ФНЦ БСТ РАН (№ 4 от 05.02.2019).

Для проведения эксперимента было отобрано 20 половозрелых крыс, из которых были сформированы две группы: контрольная (n=10) и опытная (n=10). Животные контрольной группы получали основной рацион (ОР), животные опытной группы – ОР с добавлением пятиводного сульфата марганца ($MnSO_4 \times 5H_2O$) в дозе 1433 мг/кг в течение 28 дней. Подбор дозы соли марганца был проведен на основе данных информационных систем GESTIS Substance Database и Европейского агентства по химическим веществам (ECHA).

Весь период эксперимента животных содержали на ОР в виде корма «Дельта Фидс» («БиоПро», г. Новосибирск), со свободным доступом к воде и пище, при температуре $22 \pm 1^{\circ}C$ в пластиковых клетках с подстилкой из древесных опилок в условиях искусственного освещения (12-часовой световой день) и приточно-вытяжной вентиляции.

По окончании подготовительного периода у животных осуществлялся забор крови из сердечной артерии в вакуумные пробирки VACUETTE с активатором свертывания крови и гелем (Greiner Bio-One International AG, Австрия) для определения валового содержания эссенциальных микроэлементов и анализа отдельных химических форм Mn в сыворотке крови («speciation analysis»).

Определение валового содержания жизненно необходимых микроэлементов и отдельных металл-лигандных форм Mn в сыворотке крови осуществлялось с помощью масс-спектрометра NexION 300D (PerkinElmer Inc., США) в сочетании с жидкостным хроматографом PerkinElmer Series 200 (PerkinElmer Inc., США) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией с индуктивно-связанной плазмой (ВЭЖХ-ИСП-МС).

Обработку полученных данных проводили при помощи методов вариационной статистики с использованием статистического пакета «StatSoft STATISTICA 10». (StatSoft Inc., США). Гипотеза о принадлежности данных нормальному распределению 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 (Q₂₅-Q₇₅) (Зайцев, 2006).

Результаты и обсуждение. Установлено, что субхроническое пероральное поступление Mn приводило к достоверному изменению концентрации данного микроэлемента в сыворотке крови, характеризующееся увеличением циркулирующего уровня Mn в 1,7 раз относительно контрольных значений ($p \leq 0,01$) (рис. 1). Известно, что при нормальном физиологическом состоянии гомеостаз Mn хорошо контролируется гепатобилиарной экскрецией (до 99 %), в результате чего биологический период полураспада Mn у здоровых крыс после перорального поступления составляет около 24 часов (Klaassen, 1974). Возможно, что хроническое низкоуровневое воздействие Mn приводило к подавлению механизмов гомеостатического контроля, в результате чего стабильные уровни Mn повышались.

На фоне этого уровень таких эссенциальных микроэлементов, как Fe и Cu в сыворотке крови животных опытной группы был статистически значимо ниже контрольных значений в 1,2 ($p \leq 0,05$) и 1,3 ($p \leq 0,01$) раза, соответственно (рис. 2А, рис. 2В). В то же время, отмечалась тенденция к снижению сывороточной концентрации Zn, что может свидетельствовать о начальных стадиях нарушения обмена, которые могут сформироваться при продолжении воздействия.

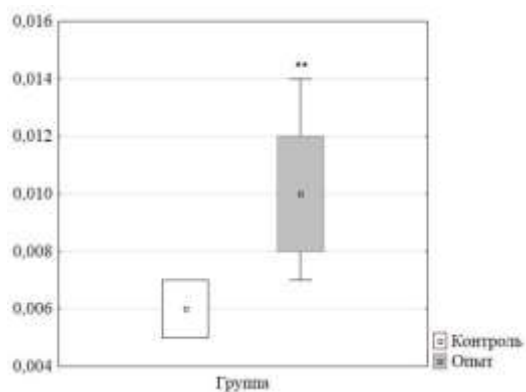


Рис. 1. Концентрация марганца в сыворотке крови лабораторных животных, мкг/мл: ** – $P \leq 0,01$

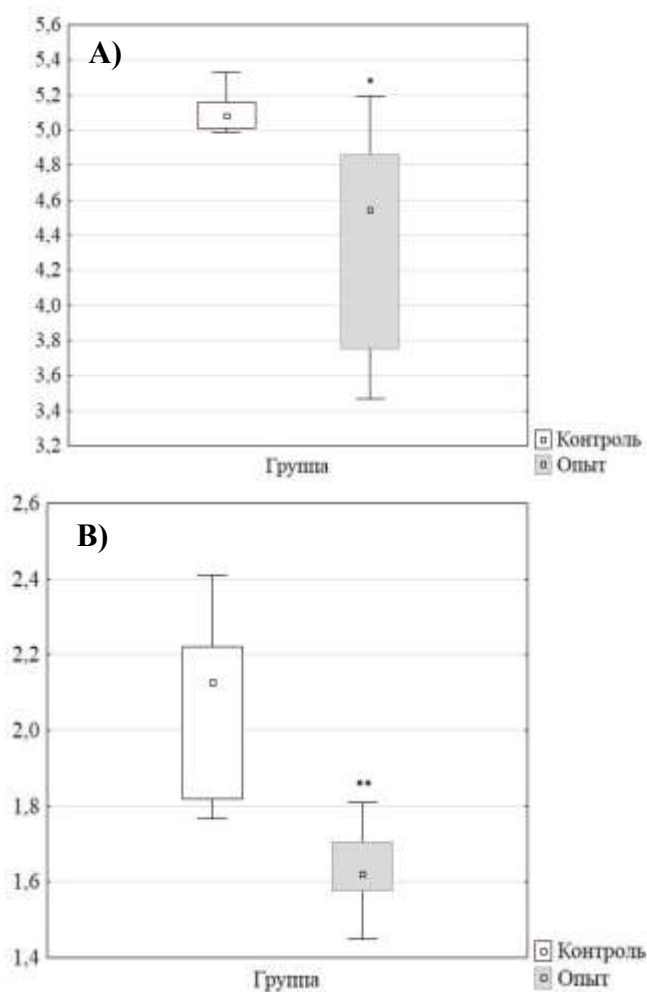


Рис. 2. Концентрация железа (А) и меди (В) в сыворотке крови лабораторных животных, мкг/мл: * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$

Mn, Fe, Cu и Zn относятся к группе жизненно необходимых микроэлементов, играющих важнейшую роль в физиологических функциях. Нарушение гомеостаза данных металлов может оказать неблагоприятное воздействие на ряд биологических процессов организма, и даже стать причиной развития неврологических заболеваний (Mezzaroba et al., 2019). Выявленное достоверное снижение уровней Fe и Cu в сыворотке крови обосновывается избыточным поступлением в организм лабораторных животных функционального антагониста этих металлов – Mn. Всасывание данных элементов в желудочно-кишечном тракте осуществляется общими транспортными системами, и, следовательно, пищевой статус Mn способен влиять на кинетику данных химических элементов (Mercadante et al., 2016; Liu Q et al., 2021). Следует отметить, что полученные результаты согласуются с рядом исследований. В одной из работ сообщалось, что хроническое воздействие Mn изменяет гомеостаз Fe в системном кровообращении, снижая его содержание (Zheng et al., 1999). Как известно, дефицит Fe может способствовать еще большему увеличению всасывания Mn (Ye et al., 2017). Это может стать серьезной проблемой для людей с диагностированным дефицитом Fe, проживающих в регионах с высоким уровнем воздействия Mn.

Для дальнейшей характеристики гомеостаза Mn в условиях его хронического воздействия, моделируемого его избыточным введением с рационом питания, был проведен *speciation analysis* с использованием комбинированной техники ВЭЖХ-ИСП-МС (HPLC-ICP-MS). Установление природы химических форм Mn является ценным источником информации о его транспорте, распределении и превращениях в живом организме.

Известно, что Mn является достаточно активным химическим элементом, в связи с чем в организме он стабилизируется в комплексе с различными биологическими лигандами (Michalke et al., 2013). В проведенном исследовании было установлено, что Mn сыворотки крови крыс линии Wistar в основном связан с соединениями с высокой молекулярной массой, такими фракциями как трансферрин/альбумин (Mn-Tf/Alb), в меньшем количестве с фракцией α -2-макроглобулина (Mn-A2M); с низкомолекулярными соединениями (Mn-LMM), а также представлен свободной неорганической формой (Mn-free).

Установлено, что субхроническое пероральное воздействие Mn сопровождалось достоверными изменениями распределения молекулярных форм Mn в сыворотке крови (рис. 3).

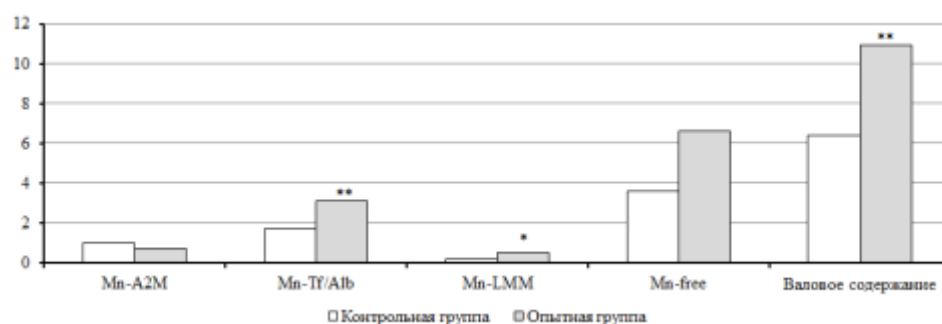


Рис. 3. Концентрация марганцевых фракций в сыворотке крови животных, мкг/л: *– $P \leq 0,05$; **– $P \leq 0,01$

Среди органических форм, в частности, было зафиксировано, что концентрации Mn-Tf/Alb была достоверно больше контроля в 1,9 раза ($p \leq 0,01$). Отмечено статистически значимое увеличение уровня фракции Mn-LMM в 4 раза ($p \leq 0,05$) по сравнению с контрольными значениями. При этом данные различия были одинаково выражены и достоверны как при оценке процентного вклада данной формы (%) в сывороточную концентрацию Mn, так и при ее выражении в абсолютных величинах (мкг/мл) (рис. 4).

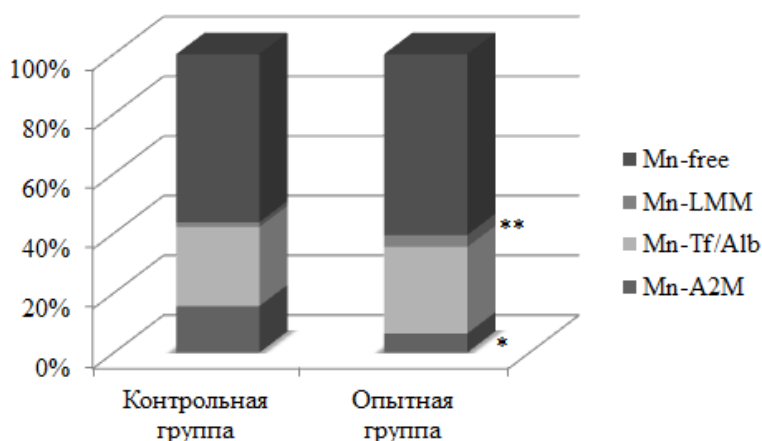


Рис. 4. Процентное распределение марганца по фракциям в сыворотке крови животных, %: *– $P \leq 0,05$; **– $P \leq 0,01$

Стоит отметить, что уровень сывороточной фракции Mn-A2M имел достоверно более низкое процентное содержание, будучи практически на 10 % ниже соответствующих контрольных значений. В то же время, абсолютные значения содержания сывороточной фракции Mn-A2M не характеризовались значимыми отличиями.

Полученные результаты анализа соединений химических элементов «*speciation analysis*», наглядно демонстрируют, что

длительное воздействие субхронических доз Mn может привести к смещению его металл-лигандных форм в сторону низкомолекулярных соединений, что может быть связано с перегрузкой других транспортных молекул. Предполагается, что именно Mn-LMM способны преодолевать гематоэнцефалический барьер и накапливаться в головном мозге, вызывая нейротоксический эффект (Michalke, 2016). Данный факт порождает необходимость проведения дальнейших исследований.

Заключение. В ходе проведенного исследования было установлено, что субхроническое пероральное воздействие Mn приводит к достоверному повышению содержания данного микроэлемента в сыворотке крови на фоне статистически значимого снижения уровня жизненно необходимых элементов – Fe и Cu. На фоне повышения валового содержания Mn в сыворотке крови происходит перераспределение данного металла по его металл-лигандным формам – происходит смещение уровней марганцевых фракций в сторону Mn-LMM, что может быть связано с перегрузкой других транспортных молекул. Таким образом, полученные результаты исследования позволяют заключить, что субхроническое пероральное воздействие Mn приводит к кумуляции данного химического элемента в организме животных и нарушению элементного гомеостаза.

Список литературы

- Айсувакова О.П.* 2018. Speciation-анализ соединений химических элементов в объектах окружающей среды: современное представление // Микроэлементы в медицине. Т. 19. № 2. С. 12-26.
- Зайцев В.М.* 2006. Прикладная медицинская статистика: учебно-практическое пособие. Москва: Фолиант, 2006. 432 с.
- Корчина Т.Я., Миняйло Л.А., Корчин В.И.* 2018(а). Избыточная концентрация марганца в питьевой воде и риск для здоровья населения северного региона // Здоровье населения и среда обитания. № 2. С. 228-33.
- Корчина Т.Я., Миняйло Л.А., Сафарова О.А., Корчин В.И.* 2018(б). Сравнительные показатели содержания железа и марганца в волосах у женщин северного региона с различной очисткой питьевой воды // Экология человека. С. 4-9.
- Оберлис Д., Харланд Б., Скальный А.* 2018. Биологическая роль макро- и микроэлементов у человека и животных. Санкт-Петербург: Наука. 658 с.
- Радыш И.В., Скальный А.В., Нотова С.В., Маршинская О.В., Казакова Т.В.* 2017. Введение в элементологию. Оренбург: ОГУ. 183 с.
- Скальный А.В., Афтанас Л.И., Березкина Е.С., Бонитенко Е.Ю., Бурцева Т.И., Вареник В.И., Грабеклис А.Р., Демидов В.А., Киселев М.Ф.,*

- Николаев В.А., Скальная М.Г.* 2011(a). Элементный статус населения России. Часть 2. Элементный статус населения Центрального федерального округа. Санкт-Петербург: Медкнига «ЭЛБИ-СПб». 382 с.
- Скальный А.В., Афтанас Л.И., Березкина Е.С., Бонитенко Е.Ю., Бурцева Т.И., Вареник В.И., Грабеклис А.Р., Демидов В.А., Киселев М.Ф., Николаев В.А., Скальная М.Г.* 2012(b). Элементный статус населения России. Часть 3. Элементный статус населения Северо-Западного, Южного и Северо-Кавказского федеральных округов. Санкт-Петербург: Медкнига «ЭЛБИ-СПб». 448 с.
- Скальный А.В., Афтанас Л.И., Березкина Е.С., Бонитенко Е.Ю., Бурцева Т.И., Вареник В.И., Грабеклис А.Р., Демидов В.А., Киселев М.Ф., Николаев В.А., Скальная М.Г.* 2013(c). Элементный статус населения России. Часть 4. Элементный статус населения Приволжского и Уральского федеральных округов. Санкт-Петербург: Медкнига «ЭЛБИ-СПб». 576 с.
- Скальный А.В., Афтанас Л.И., Березкина Е.С., Бонитенко Е.Ю., Бурцева Т.И., Вареник В.И., Грабеклис А.Р., Демидов В.А., Киселев М.Ф., Николаев В.А., Скальная М.Г.* 2014(d). Элементный статус населения России. Часть 5. Элементный статус населения Сибирского и Дальневосточного федеральных округов. Санкт-Петербург: Медкнига «ЭЛБИ-СПб». 544 с.
- Скальный А.В., Рудаков И.А.* 2004. Биоэлементы в медицине. Москва: Мир. 272 с.
- Черногаева Г.М., Журавлева Л.Р., Малеванов Ю.А., Пешков Ю.В., Котлякова М.Г., Красильникова Т.А.* 2022. Обзор состояния и загрязнения окружающей среды в Российской Федерации за 2021 год. Москва: Федеральная служба по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды (Росгидромет). 220 с.
- Jomova K., Makova M., Alomar S.Y., Alwasel S.H., Nepovimova E., Kuca K., Rhodes C.J., Valko M.* 2022. Essential metals in health and disease // *Chem Biol Interact.* № 367. P. 110173.
- Klaassen C.D.* 1974. Biliary excretion of manganese in rats, rabbits, and dogs, *Toxicol. Appl // Pharmacol.* № 29. P. 458-468.
- Liu Q., Barker S., Knutson M.D.* 2021. Iron and manganese transport in mammalian systems // *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* V. 1868. № 1. P. 118890.
- Martin K.V., Edmondson D., Cecil K.M., Bezi C., Vance M.L., McBride D., Haynes E.N.* 2020. Manganese Exposure and Neurologic Outcomes in Adult Populations // *Neurol Clin.* V. 38, № 4. P. 913-936.
- Mercadante C.J., Herrera C., Pettiglio M.A., Foster M.L., Johnson L.C., Dorman D.C.* 2016. The effect of high dose oral manganese exposure on copper, iron and zinc levels in rats // *Biometals.* V. 29. № 3. P. 417-422.
- Mezzaroba L., Alfieri D.F., Colado Simão A.N., Vissoci Reiche E.M.* 2019. The role of zinc, copper, manganese and iron in neurodegenerative diseases // *Neurotoxicology.* № 74. P. 230-241.

- Michalke B.* 2003. Element speciation definitions, analytical methodology, and some examples // *Ecotoxicol Environ Saf.* V. 56. № 1. P. 122-139.
- Michalke B.* 2016. Review about the manganese speciation project related to neurodegeneration: An analytical chemistry approach to increase the knowledge about manganese related parkinsonian symptoms // *J Trace Elem Med Biol.* № 37. P. 50-61.
- Michalke B., Lucio M., Berthele A., Kanawati B.* 2013. Manganese speciation in paired serum and CSF samples using SEC-DRC-ICP-MS and CE-ICP-DRC-MS // *Anal Bioanal Chem.* V. 405. № 7. P. 2301-2309.
- Ruiz-Azcona L., Fernández-Olmo I., Expósito A., Markiv B., Paz-Zulueta M., Parás-Bravo P., Sarabia-Cobo C., Santibáñez M.* 2021. Impact of Environmental Airborne Manganese Exposure on Cognitive and Motor Functions in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis // *Int J Environ Res Public Health.* V. 18. № 8. P. 4075.
- Shilnikova N., Karyakina N., Farhat N., Ramoju S., Cline B., Momoli F., Mattison D., Jensen N., Terrell R., Krewski D.* 2022. Biomarkers of environmental manganese exposure // *Crit Rev Toxicol.* V. 52. № 4. P. 325-343.
- Ye Q., Park J.E., Gugnani K., Betharia S., Pino-Figueroa A., Kim J.* 2017. Influence of iron metabolism on manganese transport and toxicity // *Metallomics.* V. 9. № 8. P. 1028-1046.
- Zheng W., Zhao Q., Slavkovich V., Aschner M., Graziano J.H.* 1999. Alteration of iron homeostasis following chronic exposure to manganese in rats // *Brain Res.* V. 833. № 1. P. 125-132.

ELEMENTAL HOMEOSTASIS DURING SUBCHRONIC EXPOSURE TO MANGANESE (EXPERIMENTAL STUDY)

T.V. Kazakova, O.V. Marshinskaya, S.V. Notova

Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies
of the Russian Academy of Sciences, Orenburg

Along with occupational exposure to Mn, the risk of chronic exposure to relatively low concentrations of this metal in the general population increases. It is known that the formation of the elemental composition of an organism is determined both by its current physiological need for chemical elements and largely depends on biogeochemical factors and technogenic load. In this regard, the aim of the study was to study the levels of essential trace elements in the blood serum and to identify the features of the distribution of Mn according to its metal-ligand forms in an experimental model of subchronic oral exposure to this metal. For the study, 20 mature rats were selected, from which two groups were formed: control (n=10) and experimental (n=10). Animals of the control group received the main diet, animals of the experimental group received a diet with additional

administration of $MnSO_4 \times 5H_2O$ at a dose of 1433 mg/kg for 28 days. At the end of the experiment, blood was taken to determine the content of microelements in blood serum by ICP-MS and metal-ligand forms of Mn by HPLC-ICP-MS. It was established that subchronic oral intake of Mn led to an increase in its concentration in blood serum by 1.7 ($p \leq 0.01$) times relative to control values against the background of a decrease in the content of Fe and Cu by 1.2 ($p \leq 0.05$) and 1.3 ($p \leq 0.01$) times, respectively. Against the background of an increase in the total content of Mn, the levels of manganese fractions shifted towards Mn-LMM. The revealed changes can serve as a prognostic tool characterizing the adverse effect of subchronic exposure to Mn.

Keywords: *manganese, toxicity, speciation analysis, complexation, metal-ligand forms, inductively coupled plasma mass spectroscopy.*

Об авторах:

КАЗАКОВА Татьяна Витальевна – младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований и металломики в животноводстве, Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук; 460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, д. 29, e-mail: vaisvais13@mail.ru.

МАРШИНСКАЯ Ольга Владимировна – младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований и металломики в животноводстве, Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук; 460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, д. 29, e-mail: m.olja2013@yandex.ru.

НОТОВА Светлана Викторовна – доктор медицинских наук, профессор, и.о. заведующего лаборатории молекулярно-генетических исследований и металломики в животноводстве, Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук, 460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, д. 29., e-mail: snotova@mail.ru.

Казакова Т.В. Состояние элементного гомеостаза на фоне субхронического воздействия марганца (экспериментальное исследование) / Т.В. Казакова, О.В. Маршинская, С.В. Нотова // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2023. № 4(72). С. 56-66.

Дата поступления рукописи в редакцию: 10.04.23

Дата подписания рукописи в печать: 01.12.23