

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

**ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ПОВРЕЖДАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ
ТОКСИЧЕСКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ МАРГАНЦА
НА КЛЕТОЧНОМ И СУБКЛЕТОЧНОМ УРОВНЯХ**

**THE STUDY OF MECHANISMS OF THE DAMAGING EFFECT
OF TOXIC CONCENTRATIONS OF MANGANESE THE CELLULAR
AND SUBCELLULAR LEVELS**

А.В. Гончаренко, М.С. Гончаренко*

A.V. Goncharenko, M.S. Goncharenko

Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина
Kharkiv National University named after V. N. Karazin, Kharkiv, Russia

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: субтоксические концентрации $MnCl_2$, эритроциты, митохондрии печени, мембранотропный эффект.

KEYWORDS: subtoxic concentration of $MnCl_2$, erythrocytes, liver mitochondrions, membrane-acting effect.

РЕЗЮМЕ. Изучено действие субтоксических концентраций хлорида марганца в дозе, соответствующей LD_{50} , на состояние плазматических мембран (модель эритроциты) и функциональную активность энергетического аппарата клетки (модель – изолированные митохондрии печени крыс).

Установлено, что хлорид марганца в исследуемых концентрациях вызывает достоверное увеличение сорбционной емкости эритроцитов к альциановому синему, рост их спонтанного гемолиза и активацию перекисного окисления липидов.

В эксперименте на изолированных митохондриях установлено, что хлорид марганца вызывает разобщение окислительного фосфорилирования и полное ингибирование дыхания в концентрациях 3 и 4,5 мМ. Выявленные зависимости свидетельствуют о том, что субтоксические концентрации марганца повреждают энергетику клетки.

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования указывают на повреждающее действие марганца и на клеточном (эритроциты), и на субклеточном (митохондрии) уровнях, которые реализуются через наружное функционирование мембранных структур, лишая их возможности к самовосстановлению.

ABSTRACT. Action of subtoxic concentration of sodium chloridum of manganese in a dose corresponding LD_{50} on a condition of plasmatic membranes (model erythrocytes) and functional activity of the power device of a cell (model – the isolated mitochondrions of a liver of rats) is studied.

It is established that manganese sodium chloridum in studied concentration causes authentic augmentation of sorbtionny capacity of erythrocytes to alcian dark blue, body height of their unexpected hemolysis and activation of peroxide oxidation of lipids.

In experiment on the isolated mitochondrions it is established that sodium chloridum of manganese causes dissociation of an oxidizing phosphorusling and complete inhibition of respiration in concentration of 3 and 4,5 mM, the taped dependences testify that subtoxic concentration of manganese damage power of a cell.

Thus, the carried-out pilot studies indicate damaging effect of manganese and on cellular (erythrocytes), and on subcellular (mitochondrions) levels which are realized through external functioning of membranous frame depriving of them possibility to itself to restoration.

ВВЕДЕНИЕ

С физиологической точки зрения марганец относится к полезным, жизненно необходимым (эссенциальным) микроэлементам, активно влияющим

* Адрес для переписки:
Гончаренко Алексей Владимирович
E-mail: valeolog@univer.kharkov.ua

на процессы обмена белков, жиров, углеводов в организме человека (Авцин и др., 1991).

Как и все элементы, Mn имеет характерный ему диапазон безопасной экспозиции, который обеспечивает оптимальные тканевые концентрации, однако у него есть свой токсический диапазон.

В основе биохимических механизмов элементного обмена в организме человека лежат свойства синергизма, антагонизма, конкуренции и замещения, которые осуществляются при изменении концентрации элементов окружающей среды (Скальный и др., 1991; Агаджанян и др., 2001; Skalny, 1999).

Актуальность данной работы связана с тем, что предыдущими нашими исследованиями было показано, что в ряде областей Украины наблюдается повышенное содержание этого элемента в воде и почве (Гончаренко и др., 2004).

Параллельное обследование детей, проживающих в этих регионах, выявило достоверное превышение ПДК марганца у них в слюне (Гончаренко и др., 2004).

Вопрос о том, как влияет повышение концентрации Mn в организме человека на его развитие и состояние здоровья, остается открытым. В то же время аналогичные зависимости по содержанию Mn в окружающей среде и в организме проживающих в этих регионах людей были выявлены московскими учеными. Отмечена взаимосвязь между повышением содержания Mn в сыворотке крови матери и новорожденного ребенка (Скальный и др., 1991; Агаджанян и др., 2001), также в регионах с повышенным содержанием Mn в окружающей среде наблюдается более частое рождение умственно отсталых детей (Агаджанян и др., 2001; Skalny, 1999; Скальный и др., 1991).

Ряд исследователей связывают увеличение содержания марганца в среде проживания и организме людей с развитием у них зоба (Антонов, Ефремов, 1999).

Наше внимание привлекли исследования ученых-медиков, которые отмечают увеличения количества неврологических расстройств, называемых марганцевым паркинсонизмом, у молодых людей, которые употребляют психостимуляторы, кустарно приготовленные на основе эфедроноподобных препаратов и перманганата калия (Волошина и др., 2000).

По их мнению основной токсический эффект при избыточном его потреблении проявляется в поражении центральной нервной системы, что позволяет отнести повышение концентрации марганца к числу нейротропных ядов, способных вызвать развитие наиболее тяжелой формы нейротоксикоза.

Отсутствие знаний в вопросе действия на организм повышенных, а порой и токсических концентраций ионов марганца, подтверждается тем, что независимо от содержания Mn в среде проживания все дети и взрослые для оздоровления получают витаминно-минеральные комплексы, со-

держащие суточную дозу Mn. Такие комплексы, как Виталюкс (США), Витрум (США), Гериавит (Швейцария), Гериамин (Россия), Капли Береша (Венгрия) и др. помимо различных витаминов и минералов содержат в составе активного вещества от 1 до 3 мг марганца (Скальный и др., 1991). И назначаются эти витаминно-минеральные комплексы без учета уже имеющейся элементной нагрузки, что может привести к необратимым повреждениям организма.

Напрашивается вывод о том, что повышение содержания микроэлемента Mn в окружающей среде выше ПДК является опасным для здоровья человека так же, как и чрезмерное его получение с пищей, витаминами и БАД.

К сожалению, в научной литературе исследование механизмов токсического действия повышенных концентраций Mn на организм человека освещены недостаточно.

Для выяснения влияния субтоксических концентраций марганца на организм человека были предприняты модельные исследования, так как проводить такие эксперименты на людях невозможно.

Предполагалось изучить действия субтоксической дозы хлорида марганца на следующих моделях:

эритроцитарной, позволяющий оценить состояние плазматической клеточной мембраны под действием $MnCl_2$ в концентрации LD_{50} ;

изолированных митохондрий печени крыс, позволяющих определить действие хлорида марганца на энергетический потенциал клетки.

Цель представленной работы состояла в изучении в модельных условиях (в эксперименте) влияния субтоксических концентраций хлорида марганца на клеточном и субклеточном уровнях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В модельных опытах *in vitro* исследовали прямое токсическое влияние хлорида марганца в концентрациях $10^{-7}M$ и $10^{-5}M$ на сорбционную емкость гликокаликса эритроцитов к альциановому синему (СЕГАС). Инкубацию осуществляли 20 мин, после чего определяли СЕГАС по сравнению с контролем (Арцишевская, Самойлова, 1983).

Интенсивность ПОЛ в гомогенатах печени крыс определяли по скорости накопления малонового диальдегида, содержание ТБК-активных продуктов – спектрофотометрически. (Ohkawa, 1979), гемолиз эритроцитов – по методу Ятера, содержание белка – по методу Лоури в модификации Миллера (Владимиров, Арчаков, 1972).

Полученные данные обрабатывали статистически.

Влияние токсических доз хлорида марганца на энергетику клетки проводили на изолированных митохондриях печени крыс.

Митохондрии выделяли при помощи дифференциального центрифугирования как описано в

работе (Маслова, 1975) в среде 0,3 М сахарозы и 2 мМ ЭДТА 10 мМ Tris – HCl (Imberti, 1993).

Оценку дыхательных параметров митохондрий выполняли с помощью закрытого платинового электрода Кларка в термостатируемой ячейке вместимостью 1 мл при 26° С на полярографе «Rank Brother» model 20 (Великобритания), соединенным с персональным компьютером.

Субстрат дыхания – малат (5 мМ) и глутамат (5 мМ).

Окислительное фосфорилирование инициировали добавкой АДФ (250 мкМ), разобщение дыхания и фосфорилирования вызывали 2,4-ДНФ (1000 мкМ) или хлоридом марганца (1,5–4,5 мМ), который готовили на среде измерения.

Среда для полярографического измерения содержала 200 мМ маннита, 50 мМ сахарозы, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ KH_2PO_4 , 30 мМ Tris – HCl (pH 7,4 при 26 °С). Расчет скоростей дыхания выполняли по Чансу. Скорость дыхания выражалась в нмоль O_2 /мг белка/ мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эритроцитарная модель. Исследование влияния катионов марганца на поверхность плазматической мембраны эритроцитов проводилось при инкубации красных кровяных клеток в течение 20 мин в присутствии 10^{-7} М и 10^{-5} М MnCl_2 и альцианового синего. После завершения инкубации определяли сорбционную емкость эритроцитов к альциановому синему (СЕГАС) под действием марганцевой интоксикации в сравнении с контролем (табл. 1).

Как следует из представленных данных, после инкубации эритроцитов с обеими концентрациями 10^{-7} М и 10^{-5} М MnCl_2 наблюдается достоверное увеличение их сорбционной емкости. Возможно, взаимодействие с ионами марганца изменяет сорбционные свойства гликокаликса клеток, что проявляется в усилении их окрашивания кра-

сителем и изменении (нарушении) функциональных и физиологических свойств клеток.

Изменение поверхности эритроцитов после нагрузки солями марганца могут быть следствием окислительной дегградации плазматических мембран, так как марганец является сильным окислителем.

Исследование уровня ТБК-активных продуктов в печени крыс подтвердило мнение о возможной активации ПОЛ после введения солей марганца (табл. 2).

Интенсивность аскорбат-зависимого ПОЛ после введения MnCl_2 также достоверно повышается по сравнению с контролем.

Известно, что активация ПОЛ снижает прочность эритроцитарной мембраны. Поэтому было исследовано влияние солей марганца на гемолитические свойства эритроцитов крыс. Обнаружено, что марганцевая нагрузка оказывает существенное влияние на осмотическую резистентность эритроцитов: уровень спонтанного гемолиза увеличивается на 42%.

Влияние хлорида марганца на степень спонтанного гемолиза эритроцитов: контроль – $9,25 \pm 2,32\%$; MnCl_2 – $20,0 \pm 2,12\%$ ($p < 0,05$ по отношению к контролю).

Осмотическая устойчивость эритроцитов является важным интегральным показателем барьерной и транспортной функции клетки, определяющих ее функциональную активность. Можно предположить, что на уровне организма после поступления Mn в кровь, он проникает в эритроциты за счет образования комплексов соединений с белками гликопептидами (гликокаликсом) и транспортируется по организму к различным органам и тканям, где адсорбируется активно метаболизирующими: печенью, почками, поджелудочной железой, железами внутренней секреции и другими органами.

Таким образом, проведенные исследования позволяют заключить, что в механизме токсиче-

Таблица 1. Влияние субтоксических концентраций хлорида марганца на сорбционную емкость гликокаликса эритроцитов к альциановому синему, %

Контроль без марганца	Инкубация с MnCl_2 , 10^{-7} М	Инкубация с MnCl_2 , 10^{-5} М
$47,6 \pm 1,9$	$56,7 \pm 2,2$	$53,4 \pm 1,8$
По отношению к контролю	$p < 0,05$	$p < 0,05$

Таблица 2. Содержание ТБК-активных продуктов в печени крыс

Группа	ТБК – активные продукты, нмоль МДА/мг белка	Индукция ПОЛ, нмоль МДА/мг белка
Контроль	$0,25 \pm 0,04$	$0,32 \pm 0,04$
Нагрузка MnCl_2	$0,51 \pm 0,03^*$	$0,59 \pm 0,06^*$

Примечание: * $p < 0,05$ достоверно относительно величины в контроле.

ского действия катионов марганца важную роль (возможно ведущую) играет повреждение клеточных мембран, ее поверхностных свойств, ведущих к дестабилизации мембран прежде всего через активацию окислительных процессов. Нарушение плазматической клеточной мембраны может привести к изменению ее мембранного потенциала, транспортных свойств, проницаемости, нарушению и перераспределению баланса внутриклеточных микроэлементов. Как правило, эти изменения разрушают рецепторный аппарат клетки и изменяют ее реакции на внутриорганизменные регуляторные сигналы, что может вызвать нарушение биокommunikаций, функциональной активности клетки, обмена веществ, гомеостаза организма и развития патологического состояния.

В целом полученные данные модельного исследования на эритроцитах по динамике СЕГАС, осмотической устойчивости, активации ПОЛ и других показателях могут быть указанием на то, что первичным механизмом в марганцевой интоксикации организма является повреждение функциональных свойств плазматической мембраны клеток.

Митохондриальная модель. В исследованиях на эритроцитах было показано повреждающее действие субтоксических концентраций Mn на сорбционные свойства плазматической мембраны красных кровяных клеток, что значительно ухудшало их гемолитические свойства, вызывало активацию перекисных процессов, изменяло активность ферментов и, в целом, позволило сделать заключение о мембранотоксическом эффекте повышенных концентраций Mn.

Таким образом, токсическая концентрация Mn оказывает свое повреждающее действие через изменение, прежде всего, функциональных свойств мембран.

Среди внутриклеточных мембранных структур наше внимание больше всего привлекают митохондрии – энергетическая система клеток, функциональная активность которой определяется сопряженной работой ферментов дыхательной цепи, обеспечивающих в процессе окислительного фосфорилирования синтез макроэргических связей. Эффективность работы ферментов дыхательной цепи митохондрий зависит от наличия достаточной концентрации во внутриклеточной среде магния, который обеспечивает активную работу ферментов (Скальный и др., 1991). Марганец является антагонистом магния и способен заменять его в активных центрах ферментов дыхательной цепи (Скальный и др., 1991).

Как влияет такая замена на функциональную активность митохондрий, предстояло выяснить в эксперименте на изолированных митохондриях печени крыс.

Дыхательная активность изолированных митохондрий является чувствительным показателем состояния клетки. Она изменяется при введении БАВ, гормонов, токсических агентов. Одним из основных механизмов действия (Imberti, 1993;

Beavis, 1989; Howard, 1995) подобных агентов является увеличение протонной проводимости внутренней мембраны митохондрий, что сопровождается уменьшением электрохимического потенциала $\Delta\mu\text{H}^+$, и соответственно энергетического сопряжения.

Свежеизолированные митохондрии на протяжении 3–3,5 ч после выделения характеризуются низкой скоростью дыхания в состоянии V_4 по Чансу при окислении субстрата малат+глутамат. Согласно Чансу, скорость поглощения (рис. 1) O_2 в стационарном состоянии определяется пассивной диффузией протонов, поэтому низкая скорость V_4 указывает на сохранение барьерных свойств внутренней мембраны контрольных митохондрий. Добавка АДФ (состояние V_3) многократно увеличивала скорость поглощения кислорода, что указывало на высокую сопряженность дыхания и окислительного фосфорилирования. Дыхательный контроль (ДК) – отношение скорости дыхания V_3/V_4 составил не менее 5 (рис. 1).

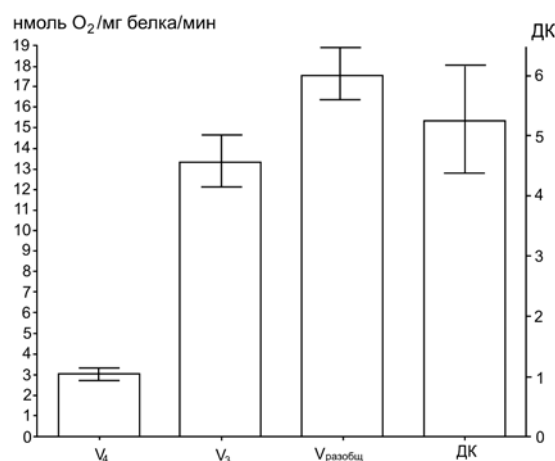


Рис. 1. Скорость дыхания изолированных митохондрий при окислении малата и глутамата ($M \pm m$)

После исчерпания АДФ и перехода органелл в состояние V_4 разобщитель 2,4-ДНФ (состояние V_4 разобщенное) увеличивал скорость потребления O_2 более, чем в 6 раз, что указывает на сохранность ферментативных систем окисления НАД-зависимых субстратов.

Таким образом, в процессах энергетического обмена существуют примерно три участка, повреждение которых может привести к нарушению окислительного фосфорилирования. Первым является мембранная организация ферментов дыхательной цепи, вторым – механизмы сопряжения окисления и фосфорилирования, третьим – механизм накопления энергии (Скулачев, 1969).

Для определения устойчивости дыхания митохондрий к MnCl_2 было проведено титрование и установлена ингибирующая концентрация. С целью выяснения влияния хлорида марганца на сво-

бодное окисление субстратов митохондриями измерения проводили в присутствии 2,4-ДНФ, т.е. в условиях максимальной кинетической способности редокс-переносчиков. Внесение 0,5–3 мМ $MnCl_2$ после 2,4-ДНФ не вызывало изменения скорости поглощения O_2 , однако дальнейшее повышение концентрации до 4 мМ в полярографической ячейке приводило к резкому угнетению дыхания.

Способность многих фармакологических препаратов, таких как бенциклан фумарат, свободных жирных кислот, хлороформа и других веществ воздействовать на пассивную ионную проницаемость рассматривается в качестве одного из механизмов управления продукцией АТФ клетки (Белоус, 1976; Luvisetto, 1988). Частичное или полное рассеивание потенциала на внутренней мембране митохондрий повышает скорость окисления субстратов в клетке, ускоряет гидролиз АТФ посредством АТФазы митохондрий. Обратимость и глубина таких изменений будет носить важный прогностический характер в дальнейшей судьбе не только совокупности всех митохондрий, но и клетки в целом. Для выяснения способности $MnCl_2$ оказывать протонофорный эффект, митохондрии были энергизированы субстратами после чего вносился $MnCl_2$ от 1 до 6 мМ. Из рис. 2 видно, что 1,5 мМ хлорида марганца вызывал слабую стимуляцию дыхания, которое в течение 2–3 мин снижалось до уровня состояния V_4 .

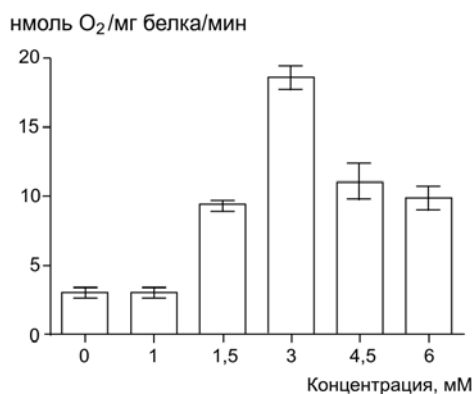


Рис. 2. Влияние различных концентраций $MnCl_2$ на скорость дыхания изолированных митохондрий при окислении малата и глутамата ($M \pm n$)

Повторное внесение 1,5 мМ $MnCl_2$ или 250 мкМ АДФ стимулировало дыхание. Это свидетельствует о том, что, во-первых, повышение пассивной ионной проницаемости, вызванное относительно малой концентрацией (1,5 мМ $MnCl_2$) является обратимым, во-вторых, данная концентрация не ингибирует фосфорилирование АДФ.

Максимальный разобщающий эффект достигается при добавке 3 мМ $MnCl_2$, по скорости поглощения O_2 он был сопоставим со значениями в случае использования 2,4-ДНФ. Дальнейшее повышение концентрации до 4,5 мМ $MnCl_2$ сопро-

вождалось резким снижением скорости дыхания и полным его ингибированием через 2–3 мин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о том, что хлорид марганца обладает свойствами разобщителя дыхания и окислительного фосфорилирования. Титрование $MnCl_2$ окисления митохондриями малата + глутамата показало, что концентрации, вызывающие разобщение и полное ингибирование, находятся в узком диапазоне (оптимальной и токсической) концентрации $MnCl_2$, что составляет в данном эксперименте 3 и 4,5 мМ $MnCl_2$.

Проведенное экспериментальное исследование позволило еще раз подтвердить, что Mn свои эссенциальные свойства проявляет только в очень узком концентрационном диапазоне – до 3 мМ. При выходе за границы (безопасной экспозиции) физиологического диапазона он начинает проявлять разрушающие свойства тяжелого металла.

Главный вывод из данного экспериментального исследования заключается в том, что нарушая функционирование мембранных митохондриальных структур, субтоксические концентрации Mn повреждают энергетику клетки, фактически лишая организм возможности к полноценному функционированию.

Возможно именно повреждение токсическими дозами Mn внутриклеточного митохондриального аппарата является причиной энергетической ущербности больных марганцевым паркинсонизмом (Волошина и др., 2000).

Таким образом, первое и второе экспериментальное исследование показали, что повреждающее действие субтоксических концентраций марганца и на клеточном (эритроциты), и на субклеточном (митохондрии) уровнях реализуется через нарушение функционирования мембранных структур, лишая их возможности к регуляторному самовосстановлению.

ЛИТЕРАТУРА

- Агаджанян Н. А., Велдашова М. В., Скальный А. В. Экологический портрет человека и роль микроэлементов. М.: Изд. КМК. 2001. 236с;
- Антонов А.Р., Ефремов А.В. Микроэлементы в жизни человека. Природные минералы на службе здоровья человека. Новосибирск: Экор. 1999. С. 28–39.
- Арцишевская Р. А., Самойлова К. А. Функциональные и структурные изменения поверхности эритроцитов человека после облучения УФ-лучами разной длины волны // Цитология. 1983. Т. 25. № 12. С. 1387–1392.
- Белоус А.М. 1-бензил-1-(3'-диметиламинопропокси)-циклопентанфумарат, как разобщитель и ингибитор дыхательной цепи // Биохимия. 1976. Т. 41. Вып. 5. С. 881–884.
- Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука. 1972. С. 241–243.

- Гончаренко М. С., Коновалова О. О., Гончаренко О. В., Светлакова Н. М. Вплив екологічних чинників на стан мінерального обміну у школярів міст Запоріжжя і Харків та шляхи його корекції // Людина та навколишнє середовище – проблеми безперервної екологічної освіти в вузах // Збірник наукових праць. Одеса. 2004. С. 107–109.
- Гончаренко М.С., Коновалова Е.О., Кобзарь Н.В., Гончаренко А.В., Светлакова Н.Н., Лебедев В.А. Состояние минерального обмена у детей на различных экологических районах и пути его коррекции // Экология и здоровье человека. Охрана водного и воздушного бассейнов. Утилизация отходов: сб. науч. тр. XI Междун. науч.-техн. конф. Бердянск. 9–13 июня. 2003. Т. 2. С. 328–335.
- Гончаренко М.С., Коновалова Е.О., Кобзарь Н.В., Гончаренко А.В., Светлакова Н.Н. Вплив екологічних чинників на стан мінерального обміну у школярів міст Запоріжжя і Харкова та шляхи його корекції / Людина та навколишнє середовище – проблеми безперервної екологічної освіти в вузах // збірник наукових праць. Одеса. 21–24 вересня 2004. С. 107–109.
- Маслова И. М., Горская И. А., Шульц К. Ф. и др. Выделение интактных митохондрий из печени крыс / Методы современной биохимии. М.: Наука. 1975. С. 45–47.
- Авцин А. П., Жаворонков А. А., Риш М. А., Строчкова Л. С. Микроэлементозы человека. М.: Медицина. 1991. 496 с.
- Волошина Н. П., Тайцлин В. И., Линский И. В., Богданова И. В., Кузьминов В. Н. Психологические и неврологические расстройства вследствие употребления психостимуляторов кустарного изготовления, получаемого из препарата «Эффект» // Український вісник психоневрології. 2000. Т. 8. Вип. 2. С. 74–76.
- Скальный А. В. Микроэлементы: бодрость, здоровье, долголетие. М.: Эксмо. 2010. 288 с.
- Скулачев В. П. Аккумуляция энергии в клетке. М.: Наука. 1969. 439 с.
- Beavis A.D. On the inhibition of the mitochondrial inner membrane anion uniporter by cationic amphiphiles and other drugs // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 1508–1515.
- Howard B. J., Pohorecki R., Becker G. L., et al. Energy status in anoxic rat hepatocytes: effects of isoflurane, solution composition, and hypothermia // Liver Transpl. Surg. 1995. V. 1. № 4. P. 220–224.
- Imberti R., Nieminen A. L., Herman B., et al. Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butylhydroperoxide: protection by fructose, cyclosporin A and trifluoperazine // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1993. V. 265. № 1. P. 392–400.
- Luvisetto S., Pietrobon D., Azzone G. F. Uncoupling of oxidative phosphorylation induced by FCCP oleic acid and chloroform in rat liver mitochondria // Prog Clin Biol Res. 1988. V. 273. P. 395–400.
- Ohkawa H., Ohani N., Jadi K. Assay for peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // Anal. Biochem. 1979. V. 95. № 2. P. 351–358.
- Skalny A, Odinyeva N, Lukoyanova O., et al. Trace elements in newborns and their mothers from the different regions of Russia// Proc. 2nd Int. sump. on trace elements in human: new perspectives. Athens. 7–9 oct. 1999 Athens. P. 41.