

ЭФФЕКТЫ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ ДОЗИРОВКИ ЦИНКА НА ФУНКЦИИ ПОЧЕК И МЕТАБОЛИЗМ КАЛЬЦИЯ В УСЛОВИЯХ СВИНЦОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Кокаев Р.И., Брин В.Б.

ФГБУН Институт биомедицинских исследований ВНИЦ РАН, Владикавказ, e-mail: romesh_k@mail.ru

Комплексный механизм токсических эффектов соединений свинца все еще оставляет нерешенным ряд вопросов, связанных с особенностями его влияния на кальциевый метаболизм, почечную обработку катиона, характер изменения фракционного состава кальция плазмы крови. Интересным остается взаимодействие свинца с другим тяжелым металлом, обладающим важными эссенциальными свойствами, – цинком, проявляющим кальцийпротекторные свойства. В эксперименте на крысах линии Вистар изучались влияние физиологической дозировки хлорида цинка на вызываемые ацетатом свинца изменения функции почек, а также влияние цинка на изменение концентрации и соотношение различных фракций кальция в плазме крови как изолированно, так и в сочетании со свинцовой интоксикацией. Исследования показали корреляционную связь между снижением у животных с введением свинца канальцевой реабсорбции воды, протеинурией и изменениями уровня общего и белоксвязанного кальция в плазме крови, в то время как процентное соотношение ионизированного кальция было увеличено. У животных с комбинированным введением свинца и цинка изменения функций почек и гомеостаза электролитов были значительно менее выражены, а соотношение фракций кальция плазмы крови было близко к фоновым значениям. По результатам работы нами была подтверждена тропность свинца в отношении нарушений кальциевого метаболизма и функций почек и показана протекторная роль физиологических концентраций цинка в развитии свинцовой нефропатии и в кальциевом метаболизме.

Ключевые слова: свинец, свинцовая интоксикация, цинк, профилактика отравлений, кальций, кальциевый гомеостаз, почки.

EFFECTS OF PHYSIOLOGICAL DOSAGE OF ZINC ON KIDNEY FUNCTIONS AND CALCIUM METABOLISM UNDER LEAD INTOXICATION

Kokaev R.I., Brin V.B.

FGBUN Institute for Biomedical Research VSC RAS, Vladikavkaz, e-mail: romesh_k@mail.ru

The complex mechanism of the toxic effects of lead compounds still leaves unresolved a number of questions related to the peculiarities of its effect on calcium metabolism, renal cation treatment, and the nature of changes in the fractional composition of blood plasma calcium. The interaction of lead with another heavy metal with important essential properties, zinc, which exhibits calcium protective properties, remains interesting. In an experiment on Wistar rats, the effect of the physiological dosage of zinc chloride on the changes in renal function caused by lead acetate, as well as the effect of zinc on the change in the concentration and ratio of various fractions of calcium in the blood plasma, both in isolation and in combination with lead intoxication, was studied. Studies have shown a correlation between a decrease in lead administration in animals, tubular water reabsorption, proteinuria, and changes in total and protein-bound plasma calcium levels, while the percentage of ionized calcium was increased. In animals with combined administration of lead and zinc, changes in renal function and electrolyte homeostasis were significantly less pronounced, and the ratio of blood plasma calcium fractions was close to background values. According to the results of the work, we confirmed the tropism of lead in relation to disorders of calcium metabolism and kidney function, and showed the protective role of physiological zinc concentrations in the development of lead nephropathy and in calcium metabolism.

Keywords: heavy metals, lead, lead intoxication, zinc, prevention of poisoning, calcium, calcium homeostasis, kidneys.

Высокая аффинность свинца ко многим процессам в нашем организме известна уже давно. Так, выраженное влияние в связи с высокой степенью аккумуляции свинец оказывает на почки и костную ткань [1–3], как нарушая нормальный метаболизм кальция и других микро- и макроэлементов посредством изменения регуляторных гормонов (1,25-dihydroxyvitamin D3) и чувствительности костных клеток к ним, а, следовательно, нарушения

образования кальций-связывающих протеинов (остеокальцина), так и вызывая активацию перекисного окисления липидов с последующим повреждающим действием [4]. Также свинец способен нарушать синтез компонентов костного матрикса, коллагена и сиалопротеинов (остеопонтина), необходимых для нормального развития не только костной ткани, но и структур головного мозга [5]. И, наконец, этот тяжелый металл может замещать или смещать кальций из активных зон как кальциевых, так и кальций-зависимых транспортных систем, что приводит к нарушению и многих других функций и механизмов физиологической регуляции [6].

Цинк известен как фактор, участвующий в регуляции роста и развитии тканей организма, и регулятор иммунного ответа, что было доказано повышением при его участии концентрации белка остеокальцина, экспрессии гена COL1A1 и активности щелочной фосфатазы. Остеопротективная роль цинка складывается из ряда факторов. Так, цинк активирует остеобласты и стимулирует синтез коллагена, однако цинк подавляет активность остеокластов [7]. Доказана способность цинка снижать негативные эффекты ряда токсичных элементов, таких как кадмий, свинец и другие тяжелые металлы [8, 9], выполнять протективную роль при воспалении [10], стабилизируя мембраны тучных клеток. В то же время ряд работ указывает и на негативную роль высоких концентраций цинка в метаболизме ряда катионов, в частности кальция [11], что способствует формированию камней в почках [12].

Несмотря на тесную взаимосвязь токсических эффектов свинца и обмена кальция, а также неоднозначную роль цинка в кальциевом метаболизме, в литературе нет достаточного количества данных о влиянии этих металлов на распределение фракций кальция в плазме крови. В связи с этим целью данной работы было исследование влияния физиологической дозировки хлорида цинка изолированно и в сочетании с введением ацетата свинца на водовыделительную функцию почек и показатели метаболизма кальция.

Материалы и методы исследования

Исследования проводились на 60 крысах-самцах линии Вистар массой 200–300 г, разделенных на 4 группы: 1-я группа – интактные животные (фон, n=15); 2-я группа – контрольные животные с внутрижелудочным введением хлорида цинка (Zn, n=15) в дозировке 1 мг/кг массы тела (в пересчете на металл) в течение 30 дней ежедневно 1 раз в сутки (принимая во внимание нормальное суточное потребление человеком от 7,2 до 15 мг цинка, эту дозировку мы считали физиологической); 3-я группа – контрольные животные с внутрижелудочным введением ацетата свинца (Pb, n=15) в дозировке 40 мг/кг массы тела (в пересчете на металл) в течение 30 дней ежедневно 1 раз в сутки; 4-я группа – опытные животные с сочетанным внутрижелудочным введением последовательно сначала хлорида

цинка, а затем ацетата свинца (Zn+Pb, n=15) в тех же дозировках в течение 30 дней 1 раз в сутки.

Для исследования функций почек животных помещали в обменные клетки на 6 ч. В условиях спонтанного диуреза определяли объем диуреза, скорость клубочковой фильтрации по клиренсу эндогенного креатинина, рассчитывали относительную канальцевую реабсорбцию воды. Определяли: концентрацию белка (по методу Лоури), креатинина и общего кальция (Ca) в биологических жидкостях (моче и плазме крови) с помощью спектрофотометра (Arel PD-303); концентрацию натрия и калия – методом пламенной фотометрии (ФПА-2); концентрацию ионизированного кальция (Ca^{2+}) на анализаторе АЭК-01 (Кверти-Мед) с последующим расчетом его процента от общего кальция плазмы крови и доли белоксвязанной фракции (абсолютные значения и %). Статистическую обработку результатов исследования, учитывая нормальное распределение рядов сравнения, проводили с применением t-критерия Стьюдента с использованием программы GraphPad Prizm 6.1. О наличии значимых различий и факторных влияний судили при критическом уровне значимости p , меньшем 0,05. Также проводили расчет ранговой корреляции Пирсона (r). В проведении экспериментов руководствовались статьей 11 Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964), «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985) и Правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ от 19.06.2003 г. № 267).

Результаты исследования и их обсуждение

Введение хлорида цинка через зонд в желудок в течение 1 месяца привело (рис. 1) к незначительным изменениям в водовыделительной функции почек. Введение же ацетата свинца вызвало изменение всех показателей водовыделительной функции (рис. 1): практически двукратное увеличение диуреза относительно интактных животных (на 92%; $p < 0,001$) вследствие значительного снижения канальцевой реабсорбции воды ($p < 0,001$), несмотря на статистически значимое снижение скорости клубочковой фильтрации ($p < 0,001$). Такое действие связывают с прямым повреждающим воздействием тяжелого металла на эпителий, преимущественно проксимальных канальцев, путем активации процессов перекисного окисления липидов и конкурентного нарушения работы кальциевых транспортных механизмов [2].

Экспозиция ацетата свинца на фоне хлорида цинка привела к менее выраженным изменениям водовыделительной функции почек (рис. 1): увеличению диуреза относительно интактных животных на 50% ($p < 0,001$); снижению канальцевой реабсорбции на 0,37% ($p < 0,01$); при этом скорость клубочковой фильтрации также была снижена относительно

фона ($p < 0,001$) и не отличалась статистически значимо от таковой у животных с изолированным введением ацетата свинца. Можно отметить некоторое протекторное действие соли цинка на токсическое поражение канальцев нефронов, что проявляется в меньшем (на 0,33%) снижении канальцевой реабсорбции воды, существенно отличающемся от такового у животных с изолированным введением свинца ($p < 0,001$).

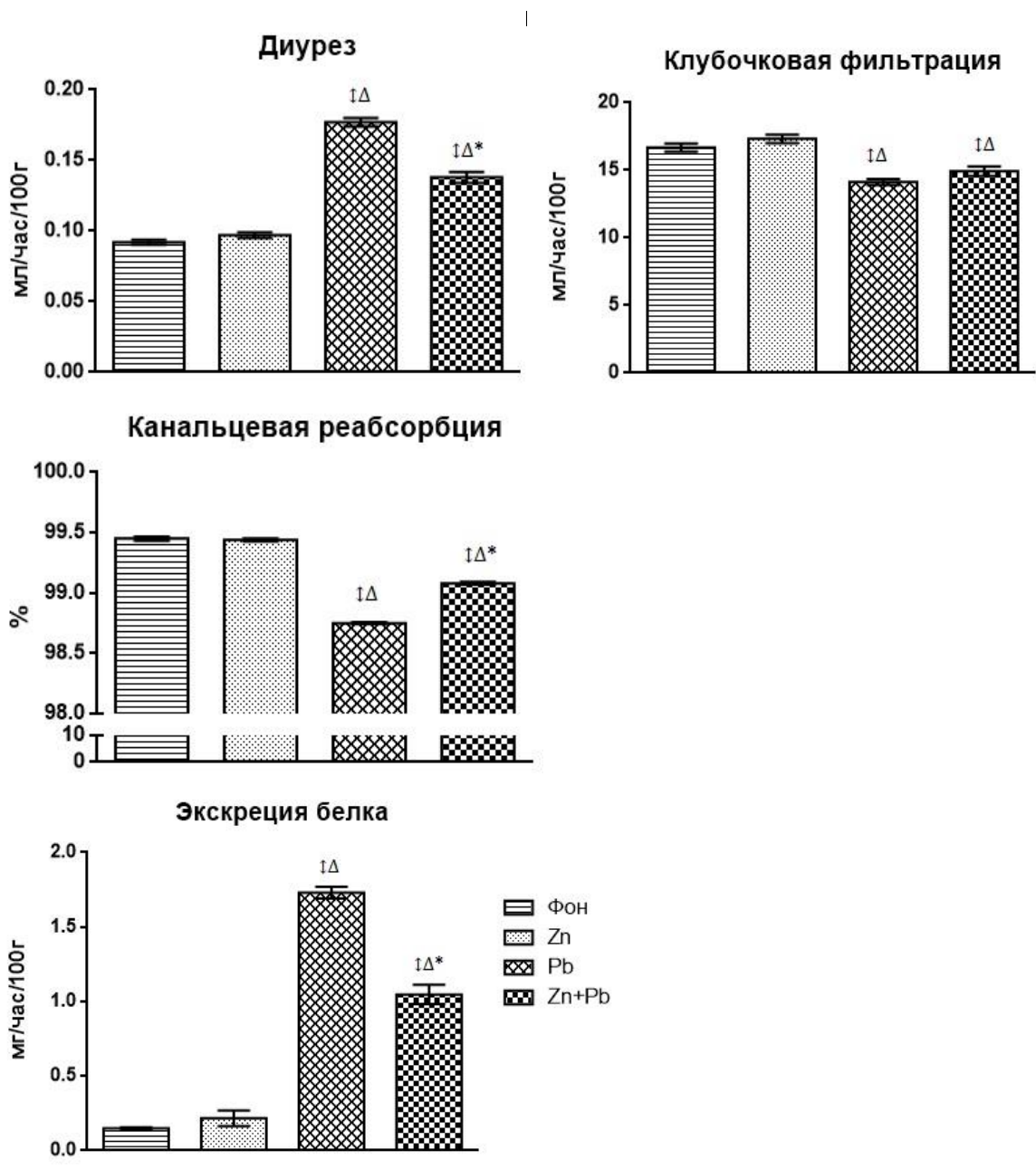


Рис. 1. Изменение водовыделительной функции почек и протеинурии на фоне изолированного и комбинированного введения хлорида цинка и ацетата свинца

↑ – статистически значимое отличие от фона; Δ – статистически значимое отличие от опыта с введением хлорида цинка; * – статистически значимое отличие от опыта с введением ацетата свинца.

Протеинурия (рис. 1) как показатель повреждения нефронов на уровне и гломерулярного фильтра, и канальцевого аппарата была отмечена у групп животных с введением ацетата свинца. При изолированном введении соединения свинца экскреция белка увеличилась более чем в 11 раз ($p < 0,001$), а при введении свинца на фоне хлорида цинка – в 7 раз ($p < 0,001$) относительно фоновых значений. Протеинурия при сочетанном введении металлов достоверно отличается от значений в группе с изолированным введением свинца ($p < 0,001$). Таким образом, здесь также можно отметить нефропротекторный эффект физиологической дозировки цинка.

В почечной обработке кальция также отмечались изменения, связанные с воздействием тяжелых металлов. Так, введение хлорида цинка (рис. 2) привело лишь к небольшому увеличению экскреции кальция ($p < 0,05$) за счет незначительного снижения его канальцевой реабсорбции ($p < 0,01$). Изолированное введение ацетата свинца вызвало повышение экскреции кальция на 51% ($p < 0,001$) за счет значительного снижения канальцевой реабсорбции катиона (на 0,67%, $p < 0,001$) на фоне выраженного снижения его фильтрационного заряда ($p < 0,001$). Сочетанное введение солей металлов привело к аналогичным изменениям почечной обработки кальция – повышению его экскреции ($p < 0,05$), снижению фильтрационного заряда ($p < 0,01$) и канальцевой реабсорбции ($p < 0,01$), однако эти сдвиги были значительно менее выраженными по сравнению с показателями при изолированной свинцовой интоксикации.

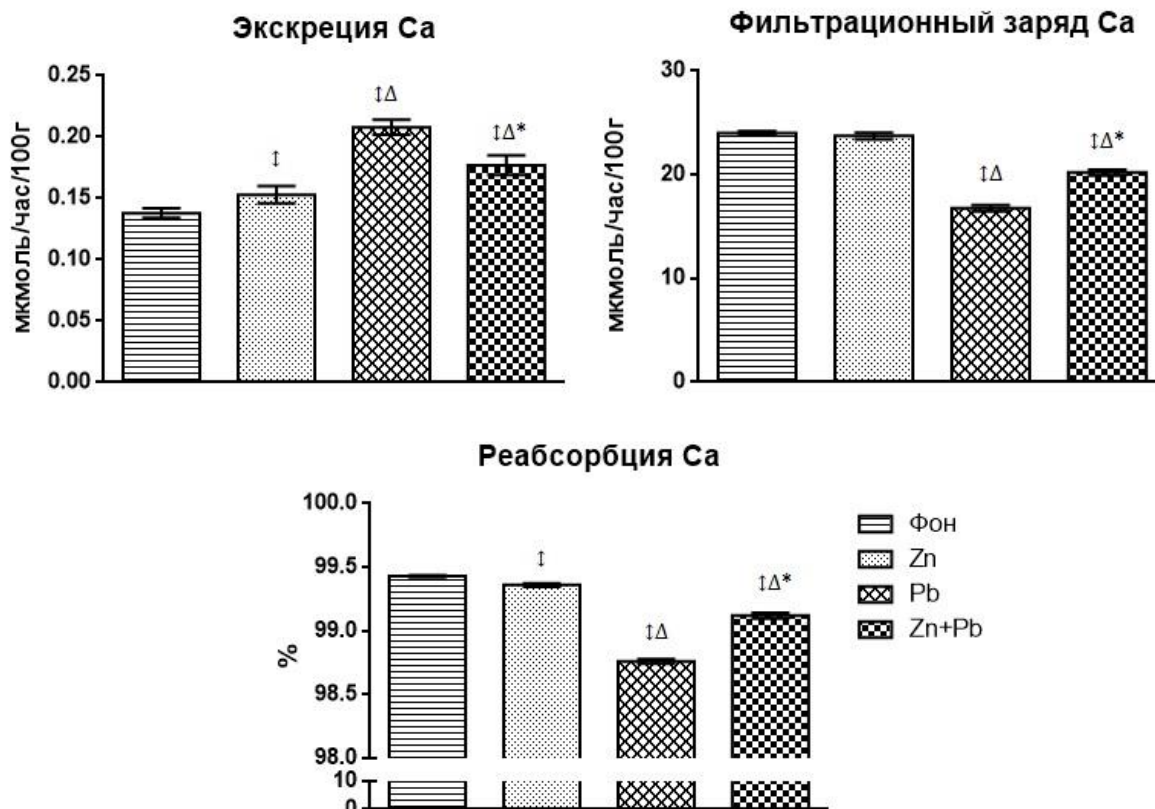


Рис. 2. Изменение метаболизма кальция на фоне изолированного и комбинированного введения хлорида цинка и ацетата свинца

↓ – статистически значимое отличие от фона; Δ – статистически значимое отличие от опыта с введением хлорида цинка; * – статистически значимое отличие от опыта с введением ацетата свинца.

Введение цинка и свинца отразилось на содержании кальция и его различных фракций в плазме крови (табл.). Концентрации общего Са ($1,826 \pm 0,017$; $p < 0,001$) и ионизированного (Ca^{2+} ; $p < 0,001$) оказались самыми минимальными у крыс с изолированным введением ацетата свинца. У животных с изолированным введением цинка и в сочетании со свинцовой интоксикацией снижение общего Са в плазме крови было ниже фоновых значений ($2,108 \pm 0,021$; $2,082 \pm 0,019$ соответственно; $p < 0,02$). В группе животных Zn+Pb уровни общего Са ($p < 0,01$) и ионизированного Ca^{2+} ($p < 0,01$) были выше такового у крыс с изолированным введением свинца. Таким образом, в группе с сочетанным введением цинка со свинцом было выявлено сниженное содержание общего и ионизированного кальция, однако значения этих показателей все же были выше, чем у животных с введением только свинца, что позволяет предположить определенный протекторный эффект цинка.

Влияние изолированного и сочетанного введения хлорида цинка и ацетата свинца на содержание и процентное соотношение фракций кальция и общего белка в плазме крови

Показатель	Статистические показатели	Группы животных			
		Фон	Zn	Pb	Zn+Pb
Общий Са в плазме крови, ммоль/л	M±m	2,214±0,013	2,108±0,021	1,826±0,017	2,082±0,019
	p		↓	↓Δ	↓*
Са ²⁺ плазмы, ммоль/л, %	M±m	0,924±0,008 41,7%	0,902±0,004 42,7%	0,812±0,011 44,4%	0,889±0,009 42,4%
	p		↓	↓Δ	↓Δ*
Белоксвязанный Са, ммоль/л, %	M±m	1,29±0,017 58,2%	1,206±0,012 57,2%	1,014±0,005 55,5%	1,193±0,007 57,3%
	p		↓	↓Δ	↓*
Общий белок, г/л	M±m	65,54±0,53	69,63±1,15	60,9±1,09	63,93±0,84
	p		↓	↓Δ	↓*

↓ – статистически значимое отличие от фона; Δ – статистически значимое отличие от опыта с введением хлорида цинка; * – статистически значимое отличие от опыта с введением ацетата свинца.

Исследование концентрации общего белка плазмы крови (табл.) позволило отметить небольшое увеличение его у животных с введением хлорида цинка ($p < 0,001$), что, возможно, связано с компенсаторным увеличением цинк-транспортирующих белков – металлотионеинов [10], синтез которых стимулируется в ответ на увеличение всасывания

металла в кишечнике, либо со стимулирующим эффектом цинка на процессы синтеза белка. Напротив, у животных с введением ацетата свинца концентрация общего белка плазмы крови была снижена ($p < 0,001$), что согласуется с данными литературы [13]. Возможно, этот эффект обусловлен гепатотоксическим эффектом тяжелого металла, а также отмеченной ранее потерей белка с мочой. Введение цинка одновременно со свинцом привело к практическому нивелированию снижения белка в крови ($p < 0,2$).

Заключение

В работе была подтверждена способность свинца изменять метаболизм кальция, что связано как с нарушением работы почек, так и с резорбцией костной ткани. Анализ изменения плазменных фракций кальция позволяет связать их с этими эффектами. Так, снижение через 1 месяц после начала введения металлов уровня общего кальция в плазме крови на фоне свинцовой интоксикации имеет корреляционные связи как с увеличением диуреза ($r=0,63$), так и со снижением канальцевой реабсорбции воды ($r=0,74$). Также прослеживается тесная корреляционная связь сниженных уровней общего кальция и его белоксвязанной фракции с выраженной протеинурией ($r=0,68$ и $r=0,73$ соответственно) и пониженной концентрацией общего белка плазмы ($r=0,63$ и $r=0,65$ соответственно). Эти данные указывают на возможный почечный генез гипокальциемии при свинцовой интоксикации. Увеличение процентной доли ионизированного кальция (табл.) на фоне постоянных потерь катиона с мочой может свидетельствовать о пополнении этой фракции за счет выхода кальция из резорбируемой костной ткани и конкурентного вытеснения катиона из сайтов связывания в клетках ионами тяжелого металла [4].

Причины незначительного снижения уровня общего кальция у крыс с изолированным введением цинка несколько иные. Так, не отмечается корреляционных связей с повышением диуреза и протеинурией. Отмечена связь с небольшим повышением экскреции катиона с мочой ($r=0,59$) за счет такого же незначительного снижения его реабсорбции, возможно, связанного с конкурирующим транспортом цинка на уровне эпителия канальцев. При этом процентное соотношение фракций ионизированного и белоксвязанного кальция (табл.) едва отличается от фоновых значений, что может говорить о сохранности механизмов регуляции гомеостаза этого элемента на фоне физиологической нагрузки цинком.

Активное участие цинка в кальциевом метаболизме проявилось в относительной нормализации уровня общего кальция плазмы крови и выравнивании соотношения фракций ионизированного и белоксвязанного кальция с показателями интактных животных (табл.). Нормализующий эффект цинка в большей степени затрагивает ионизированную форму кальция ($Pb=44,4\%$; $Zn+Pb=42,4\%$), что, возможно, является следствием способности цинка конкурировать со свинцом за транспортные механизмы и снижать накопление свинца и

вытеснение кальция из сайтов связывания катиона в костной ткани и в других клетках организма [14]. Протекторные эффекты цинка при отравлении соединениями свинца требуют дальнейшего изучения их взаимодействий на уровне клеток различных тканей, а также механизмов регулирования кальциевого гомеостаза.

Список литературы

1. Beier E.E., Holz J.D., Sheu T.-J., Puzas J.E. Elevated Lifetime Lead Exposure Impedes Osteoclast Activity and Produces an Increase in Bone Mass in Adolescent Mice. *Toxicological sciences*. 2016. Vol. 149 (2). P. 277–288. DOI: 10.1093/toxsci/kfv234.
2. Tsai T.L., Pan W.H., Chung Y.T., Wu T.N., Tseng Y.C., Liou S.H., Wang S.L. Association between urinary lead and bone health in a general population from Taiwan. *Journal of exposure science & environmental epidemiology*. 2016. Vol. 26. P. 481-487. DOI: 10.1038/jes.2015.30.
3. Wong A.K., Beattie K.A., Bhargava A., Cheung M., Webber C.E., Chettle D.R., Papaioannou A., Adachi J.D., and the Canadian Multicentre Osteoporosis Study (CaMos) Research Group. Bone lead (Pb) content at the tibia is associated with thinner distal tibia cortices and lower volumetric bone density in postmenopausal women. *Bone*. 2015. Vol. 79. P. 58-64. DOI: 10.1016/j.bone.2015.05.010.
4. Dobrakowski M., Boroń M., Birkner E., Kasperczyk A., Chwalińska E., Lisowska G., Kasperczyk S. The Effect of a Short-Term Exposure to Lead on the Levels of Essential Metal Ions, Selected Proteins Related to Them, and Oxidative Stress Parameters in Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017. Article ID 8763793. DOI: 10.1155/2017/8763793.
5. Nam S.M., Seo J.S., Nahm S.S., Chang B.J. Effects of Ascorbic Acid on Osteopontin Expression and Axonal Myelination in the Developing Cerebellum of Lead-Exposed Rat Pups. *International journal of environmental research and public health*. 2019. Vol. 19. No 16 (6). P. 983. DOI: 10.3390/ijerph16060983.
6. Mitra P., Sharma S., Purohit P., Sharma P. Clinical and molecular aspects of lead toxicity: An update. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2017. Vol. 54 (7-8) P. 506-528. DOI: 10.1080/10408363.2017.1408562.
7. Zofkova I., Davis M., Blahos J. Trace elements have beneficial, as well as detrimental effects on bone homeostasis. *Physiological research*. 2017. Vol. 66 (3). P. 391-402. DOI: 10.33549/physiolres.933454.
8. Белецкая Э.Н., Онул Н.М., Калиничева В.В. Сравнительная оценка биопротекторного действия цинка в органической и неорганической форме на остеотропность свинца в экспериментальных условиях // *Медичні перспективи*. 2016. № 21 (4). С. 123-129.

9. Брин В.Б., Кокаев Р.И., Бабаниязов Х.Х., Пронина Н.В. Возможности профилактики токсических эффектов кадмия металлокомплексом соли цинка – ацизол // Вестник новых медицинских технологий. 2008. № 15 (4). С. 213-216.
10. Jarosz M., Olbert M., Wyszogrodzka G., Młyniec K., Librowski T. Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF-κB signaling. *Inflammopharmacology*. 2017. Vol. 25 (1). P. 11–24. DOI: 10.1007/s10787-017-0309-4.
11. Crown L.A., May J.A. Zinc toxicity: denture adhesives, bone marrow failure and polyneuropathy. *Tennessee medicine: journal of the Tennessee Medical Association*. 2012. Vol. 105 (2). P. 39-42.
12. Tasian G.E., Ross M.E., Song L., Grundmeier R.W., Massey J., Denburg M.R., Copelovitch L., Warner S., Chi T., Killilea D.W., Stoller M.L., Furth S.L. Dietary Zinc and Incident Calcium Kidney Stones in Adolescence. *The Journal of urology*. 2017. Vol. 197 (5). P. 1342–1348. DOI: 10.1016/j.juro.2016.11.096.
13. Ibrahim N.M., Eweis E.A., El-Beltagi H.S., Abdel-Mobdy Y.E. Effect of lead acetate toxicity on experimental male albino rat *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 2012. Vol. 2 (1). P. 41–46. DOI: 10.1016/S2221-1691(11)60187-1.
14. Pemmer B., Roschger A., Wastl A., Hofstaetter J.G., Wobrauschek P., Simon R., Thaler H.W., Roschger P., Klaushofer K., Strelci C. Spatial distribution of the trace elements zinc, strontium and lead in human bone tissue. *Bone*. 2013. Vol. 57 (1). P. 184-193. DOI: 10.1016/j.bone.2013.07.038.