

ЗАВИСИМОСТЬ УРОВНЯ ЛАКТОФЕРРИНА ОТ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФОСФОРНО-КАЛЬЦИЕВОГО ОБМЕНА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК

THE DEPENDENCE OF THE LEVEL OF LACTOFERRIN FROM INDICATORS OF CALCIUM-PHOSPHORUS METABOLISM IN CHRONIC KIDNEY DISEASE

**S. Mirzoeva
R. Garafeeva
M. Gerikhanova**

Summary. In this study, we compared the concentration of lactoferrin in the blood and indicators of phosphorus-calcium metabolism in 40 patients with chronic kidney disease and 10 healthy volunteers. The aim of the study was to identify the dependence of the level of lactoferrin on the indicators of phosphorus-calcium metabolism in chronic kidney disease. During the study, we revealed a statistically significant difference in comparing the level of lactoferrin, phosphorus in a group of patients with chronic kidney disease of immune nature with a group of patients with chronic kidney disease of non-immune nature. It was also found that the level of lactoferrin and phosphorus in patients with chronic kidney disease of immune nature is significantly lower than in patients with chronic kidney disease of non-immune nature.

Keywords: calcium-phosphorus metabolism, lactoferrin, chronic kidney disease.

Мирзаева Сара Шамилевна
Казанский государственный медицинский
университет
sara096@mail.ru

Гарafeeva Рузана Ризвановна
Казанский государственный медицинский
университет

Гериханова Марьям Магомедовна
Казанский государственный медицинский
университет

Аннотация. В данной работе нами было проведено сопоставление концентрации лактоферрина в крови и показателей фосфорно-кальциевого обмена у 40 больных с хронической болезнью почек и 10 здоровых добровольцах. Целью исследования было выявление зависимости уровня лактоферрина от показателей фосфорно-кальциевого обмена при хронической болезни почек. В ходе исследования мы выявили статистически достоверную разницу при сравнении уровня лактоферрина, фосфора у группы пациентов с хронической болезнью почек иммунной природы с группой пациентов с хронической болезнью почек не иммунной природы. Также было установлено, что уровень лактоферрина и фосфора у пациентов с хронической болезнью почек иммунной природы достоверно ниже, чем у пациентов с хронической болезнью почек не иммунной природы.

Ключевые слова: фосфорно-кальциевый обмен, лактоферрин, хроническая болезнь почек.

В нашем исследовании мы попытались выявить зависимость уровня лактоферрина от показателей фосфорно-кальциевого обмена при хронической болезни почек.

Лактоферрин относится к группе природных иммуногенных белков молока и является представителем железосвязывающих гликопротеинов семейства трансферринов. В настоящее время лактоферрин рассматривается как возможный диагностический показатель при различных патологических состояниях [1,2]. Изучение концентраций лактоферрина может также использоваться для диагностики и мониторинга заболеваний почек [3].

Ранее было выявлено, что лактоферрин присутствует в почках: был найден мРНК лактоферрина, который экспрессируется в дистальных канальцах коркового вещества, кроме того, лактоферрин продуцируется и выделяется

в восходящей части канальца и далее реабсорбируется по ходу канальцев, в основном после насыщения железом [4]. Одной из приоритетных задач перед мировым сообществом ученых и врачей является поиск и изучение биомаркеров, отражающих нарушение функции почек. В то же время, современная персонифицированная медицина диктует необходимость определения и ассоциирования с патологическими состояниями всё большего числа молекул-предвестников болезней.

На сегодняшний день имеется мало исследований, которые отражают взаимосвязь показателей активности заболеваний почек с концентрацией лактоферрина. Наличие большого количества белка ЛФ в канальцах, но очень низкие его уровни в моче указывают на дополнительные функции ЛФ в почках. Стоит обратить внимание на то, что ЛФ участвует в метаболизме железа, поглощая свободное железо из мочи, тем самым делая его доступным для метаболизма. Также возможно, что

в качестве хелатора железа и антиоксиданта ЛФ участвует в антиоксидантных защитных системах, которые защищают почку от немикробного окислительного повреждения, то есть, при ишемии-реперфузии и воспалении. Таким образом, оценка соотношений клинической картины и экспрессии гена ЛФ может иметь большую клиническую значимость, явится основополагающей для выработки методов первичной и вторичной профилактики, диагностики, выбора тактики лечения хронической болезни почек, определения индивидуальных факторов риска и прогноза.

Также до сих пор практически не существует исследований зависимости уровня лактоферрина от показателей фосфорно-кальциевого обмена. В одной из работ Григорьевой Д. В. и соавт. [5] проводилось исследование регуляции внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция в нейтрофилах при действии рекомбинантного лактоферрина. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о способности рекомбинантного лактоферрина инициировать увеличение концентрации кальция в цитозоле нейтрофилов с последующей активацией Ca^{2+} -зависимых функциональных ответов нейтрофилов.

Кроме того, показано, что лечение блокаторами кальциевых каналов снижает выделение лактоферрина [6]. Гемодиализ с использованием цитрата в качестве антикоагулянта удаляет экстракорпорально кальций, блокируя высвобождение лактоферрина [7] из полиморфноядерных лейкоцитов.

Отметим, что ряд авторов не отметили корреляции между уровнем лактоферрина и почечной недостаточностью. Например, Deicher R. et al. [8] измеряли содержание бета (2) -микроглобулина (бета(2) м) и лактоферрина полиморфноядерных лейкоцитов при почечной недостаточности и после трансплантации почек. Полиморфноядерные лейкоциты лизировали ультразвуком и после центрифугирования оба белка анализировали в супернатанте методом иммуноферментного анализа. Несмотря на заметные различия в уровнях бета(2) м в плазме, среди анализируемых групп не было обнаружено существенной разницы в содержании бета (2) м и лактоферрина полиморфноядерных лейкоцитов. Не было также никакой корреляции между уровнем бета(2) м в плазме и содержанием бета(2) м полиморфноядерных лейкоцитов. У контрольных субъектов, а также у реципиентов почечного аллотрансплантата с хорошо функционирующим трансплантатом уровень бета(2) м полиморфноядерных лейкоцитов положительно коррелировал с уровнем лактоферрина полиморфноядерных лейкоцитов ($r = 0,55, p < 0,001; n = 55$). Оба белка считаются колокализующимися в пероксидазо-отрицательных гранулах полиморфноядерных лейкоцитов. Однако в азо-

темических и уремиических группах пациентов не было обнаружено корреляции.

Результаты иммунофлюоресцентного анализа полиморфноядерных лейкоцитов контрольной группы показали цитоплазматическое гранулированное распределение гранул обоих белков. В полиморфноядерных лейкоцитах уремиических пациентов лактоферрин перешел в перинуклеарную локализацию. Полиморфноядерные лейкоциты, полученные у уремиических пациентов, не вызывали увеличения выделения лактоферрина после стимуляции хемотаксическим пептидом f-Met-Leu-Phe по сравнению с полиморфноядерными лейкоцитами, полученными от здоровых добровольцев. Авторы отметили, что у уремиических пациентов отмечается аномалии содержания лактоферрина полиморфноядерных лейкоцитов и его высвобождение, которые являются обратимыми после успешной трансплантации почек. Обратим внимание на то, что механизмы, связанные с дегрануляцией полиморфноядерных лейкоцитов, до конца не ясны. Однако выявлено, что важную роль при этом играют внутриклеточные ионы кальция [9].

Материалы и методы

Диагностический поиск был направлен на выявление частоты нарушений фосфорно-кальциевого обмена и их связи с уровнем лактоферрина в крови.

Критерии включения: мужчины и женщины старше 18 лет; наличие хронической болезни почек, с и без признаков хронической почечной недостаточности С1-С5 согласно критериям KDIGO от 2012 года. Абсолютные критерии исключения: структурные аномалии почек, поликистозная болезнь; эндокринопатии (кроме сахарного диабета, ожирения); инфекция вирусами гепатитов, ВИЧ; системные инфекции, септические состояния; беременность.

Клинически определяли следующие показатели фосфорно-кальциевого обмена: фосфор, кальций, кальций ионизированный (колориметрический метод, ионселективные электроды), паратгормон (электрохемилюминесцентный иммуноанализ).

Определение концентрации лактоферрина в образцах крови проводили иммуноферментным методом с использованием коммерческого набора Hbt human Lactoferrin ELISA TEST KIT (HyCult Biotechnology (Нидерланды)), согласно инструкции. Расчет результатов проводят путем вычисления средних значения абсорбции (A450) для дублей каждого из стандартов, образцов и контролей. Построение калибровочной кривой проводили с использованием метода аппроксимации.

Таблица 1. Средние значения показателей фосфорно-кальциевого обмена и лактоферрина

Показатель	Референсные значения	Пациенты с хронической болезнью почек не иммунной природы		Пациенты с хронической болезнью почек иммунной природы	
		Среднее	Стандартная ошибка среднего	Среднее	Стандартная ошибка среднего
Кальций, ммоль/л	2,0–2,8	2,28	0,042	2,30	0,054
Кальций ионизированный, ммоль/л	1,03–1,23	1,24	0,02	1,26	0,02
Фосфор, ммоль/л	0,81–1,45	1,55	0,08	1,23	0,06
Паратгормон, пмоль/л	1,3–6,8	35,28	13,74	4,93	1,49
Лактоферрин, нг/мл		65,00	2,97	39,96	5,04

Исследование экспрессии гена ЛФ методом ПЦР проводилось по следующей схеме: суммарную РНК выделяли из цельной крови. РНК выделяли в соответствии с протоколом miRNEasy. Далее РНК использовалась в реакции обратной транскрипции с использованием обратной транскриптазы Superscript IV (ThermoFisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя. ПЦР проводили с использованием матермикса iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad).

Результаты

В исследовании участвовало 50 человек, из которых 10 здоровых добровольцев, вошедших в контрольную группу. Возраст 40 пациентов составил от 20 до 75 лет ($45,43 \pm 2,32$). Из них 23 женщины и 17 мужчин.

Все пациенты, участвовавшие в исследовании, разделены на следующие группы: I группа — пациенты с хронической болезнью почек иммунной природы ($n=20$); II группа — пациенты с хронической болезнью почек не иммунной природы ($n=20$); контрольная группа ($n=10$).

В первую группу вошли пациенты со следующими диагнозами: хронический гломерулонефрит, болезнь Шегрена, гипергомоцистеинемия быстро прогрессирующий гломерулонефрит микроскопический полиангиит, гломерулонефрит с полулуниями, некротизирующий капиллярит.

Во вторую группу вошли пациенты со следующими диагнозами: диабетическая нефропатия, поликистозная болезнь почек, ишемическая болезнь почек, уратная нефропатия, хроническая почечная недостаточность в исходе гипертонического нефроангиосклероза, гипер-

тонический ангиосклероз, фибромышечная дисплазия почечных артерий, ишемическая нефропатия, хронический пиелонефрит.

Из 40 пациентов 37 страдали артериальной гипертензией. Микроскопический полиангиит выявлен у 14 пациентов, хронический гломерулонефрит у 7, поликистозная болезнь почек у 2 пациентов, тромботическая микроангиопатия у 2 пациентов, у 15 пациентов Ишемическая нефропатия, первичный антифосфолипидный синдром, терминальная стадия почечной недостаточности в исходе хронического гломерулонефрита, ХБП в исходе гипертонического нефроангиосклероза, хроническая почечная недостаточность в исходе гипертонического нефроангиосклероза, хроническая почечная недостаточность смешанного генеза, хронический пиелонефрит, хронический тубулоинтерстициальный нефрит с нарушением функции почек.

По классификации ХБП (KDIGO, 2012) пациенты были распределены следующим образом:

1. Пациенты с хронической болезнью почек иммунной природы:

- ◆ C1-C2–7 пациентов;
- ◆ C3a-C5–13 пациентов;

2. Пациенты с хронической болезнью почек не иммунной природы:

- ◆ C3a-C5–20 пациентов.

При изучении частоты встречаемости нарушений фосфорно-кальциевого обмена было выявлено, что снижение уровня кальция ниже допустимых величин имеют 15% пациентов, гиперкальциемия имеется у 4% пациентов.

Средние значения показателей фосфорно-кальциевого обмена представлены в таблице 1.

По результатам обследования повышение уровня ионизированного Са имеют 12% обследованных, 42% обследованных имеют гиперфосфатемию, у 59% пациентов повышен уровень паратгормона. 5% пациентов имеют пониженный уровень паратгормона.

Среднее значение лактоферрина в исследуемой выборке составило $49,428 \pm 3,425$.

Также было проведено исследования зависимости уровня лактоферрина от высоты активности воспаления (рассчитывалось по уровню СРБ). Корреляции обнаружено не было. Однако, при этом выявлено, что у пациентов с суточной протеинурией более 150 мг сутки отмечается рост уровня лактоферрина ($53,2 \pm 4,25$ по сравнению с $43,7 \pm 8,45$ нг/мл). Корреляции между стадией ХБП и уровнем лактоферрина получено не было. При сопоставлении уровня лактоферрина у пациентов с ХБП неиммунной и иммунной природой на ранних и поздних стадиях статистически достоверных данных получено не было ($p > 0,05$).

В результате исследований выявили статистически достоверную разницу ($p < 0,05$) при сравнении уровня ЛФ ($39,96 \pm 5,04$), фосфора ($1,23 \pm 0,06$) у группы пациентов с хронической болезнью почек иммунной природы с группой пациентов с хронической болезнью почек не иммунной природы (ЛФ ($65,0 \pm 2,97$), фосфор ($1,55 \pm 0,08$)). Уровень ЛФ у пациентов с хронической болезнью почек иммунной природы достоверно ниже.

При изучении частоты встречаемости нарушений фосфорно-кальциевого обмена было выявлено, что снижение уровня кальция ниже допустимых величин имеют 15% пациентов, гиперкальциемия имеется у 4% пациентов.

При проведении корреляционного анализа показателей фосфорно-кальциевого обмена с уровнем лак-

тоферрина выявлено, что в исследуемой выборке имеется высокая корреляция ($0,828$, $p < 0,01$) только между уровнями лактоферрина, фосфора и паратгормоном. По остальным показателям фосфорно-кальциевого обмена и ЛФ статистически достоверная корреляция не выявлена.

Заключение

В данном исследовании предпринята попытка максимальной широко рассмотреть особенности взаимосвязи и прогностического значения лактоферрина и регуляции его гена с клиническими и лабораторными проявлениями хронической болезни почек, впервые в мире, так как на сегодняшний день практически не существует исследований зависимости уровня лактоферрина от показателей фосфорно-кальциевого обмена.

В ходе исследования нами было проведено сопоставление концентрации лактоферрина в крови и показателей фосфорно-кальциевого обмена у 40 больных с хронической болезнью почек и 10 здоровых добровольцах.

Выявлено, что уровень ЛФ и фосфора у пациентов с хронической болезнью почек иммунной природы достоверно ниже, чем у пациентов с хронической болезнью почек не иммунной природы. При этом данные ПЦР демонстрируют, что даже в образцах с наименьшим уровнем ЛФ, последовательность гена присутствует в геноме. Следовательно, снижение уровня ЛФ в крови может быть связано с заболеванием. Корреляции между стадией ХБП и уровнем лактоферрина получено не было. Уровень лактоферрина и фосфора у пациентов с хронической болезнью почек иммунной природы достоверно ниже, чем у пациентов с хронической болезнью почек не иммунной природы.

В дальнейшем необходимо проведение исследования с целью выявления и оценки прогностического значения лактоферрина при хронической болезни почек на более крупной выборке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Михайлова Е.И., Филипенко Н. В. Фекальный лактоферрин в выявлении колоректального рака на разных стадиях его развития // Проблемы здоровья и экологии. 2012. № 4 (34). С. 98–102
2. Зурнаджьянц В. А., Бондарев В. А., Кчибеков Э. А., Зурнаджьянц А. В. Ферропротеины в диагностике воспалительного процесса в ране при грыжах передней брюшной стенки // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. 2014. № 4 (175). С. 32–34
3. Немцова Е. Р. и др. Иммуноферментный метод определения лактоферрина человека и его использование для диагностики гнойно-септических осложнений // Вопросы медицинской химии. — 1995. — Т. 41. — № 3. — С. 58–61
4. Abrink M. et al. Expression of lactoferrin in the kidney: implications for innate immunity and iron metabolism // Kidney international. — 2000. — Т. 57. — № 5. — р. 2004–2010.
5. Григорьева Д. В. и др. Ca²⁺-сигнализация в нейтрофилах при действии рекомбинантного лактоферрина человека. — 2016. с. 239–242

6. Haag-Weber M, Schollmeyer P, Hörl WH: Granulocyte activation during haemodialysis in the absence of complement activation: Inhibition by calcium channel blockers. *Eur J Clin Invest* 1988;18:380–385. DOI:10.1111/j.1365–2362.1988.tb01027.x
7. Böhler J, Schollmeyer P, Dressel B, Dobos G et al.: Reduction of granulocyte activation during hemodialysis with regional citrate anticoagulation: dissociation of complement activation and neutropenia from neutrophil degranulation. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:234–241. DOI:10.1159/000045683
8. Deicher R. et al. Neutrophil β 2-microglobulin and lactoferrin content in renal failure patients // *American Journal of Kidney Diseases*. — 2000. — Т. 35. — №. 6. — p. 1117–1126.
9. Schmaldienst S. et al. Angiogenin: a novel inhibitor of neutrophil lactoferrin release during extracorporeal circulation // *Kidney and Blood Pressure Research*. — 2003. — Т. 26. — №. 2. — p. 107–112.

© Мирзаева Сара Шамилевна (sara096@mail.ru), Гарафеева Рузана Ризвановна, Гериханова Марьям Магомедовна.
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Г. Казань