

© Е.О. Богданова, О.Н. Береснева, И.М. Зубина, Г.Т. Иванова, М.М. Парастаева, О.В. Галкина, И.Г. Каюков, В.А. Добронравов, 2019
УДК 616.61 : 546.185-008.9 :577.38]092.4

doi: 10.36485/1561-6274-2019-23-6-83-91

Е.О. Богданова¹, О.Н. Береснева¹, И.М. Зубина¹, Г.Т. Иванова²,
М.М. Парастаева¹, О.В. Галкина¹, И.Г. Каюков¹, В.А. Добронравов^{1*}

ИНГИБИТОРЫ КАНОНИЧЕСКОГО СИГНАЛЬНОГО ПУТИ WNT И НАРУШЕНИЕ ОБМЕНА НЕОРГАНИЧЕСКОГО ФОСФАТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПОЧЕК

¹Научно-исследовательский институт нефрологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия; ²лаборатория физиологии сердечно-сосудистой и лимфатической системы Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

РЕФЕРАТ

ВВЕДЕНИЕ. Молекулярные механизмы начальных стадий нарушений обмена неорганического фосфата (Pi) при хронической болезни почек (ХБП) остаются недостаточно изученными. **ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ:** проверка гипотезы об изменении образования ингибиторов канонического сигнального пути Wnt и снижении костного обмена как одним из ранних механизмов нарушения баланса Pi при ХБП. **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** У крыс линии SHR (N=52) – животные с нефрэктомией (NE) или ложной операцией (SO) и сроками наблюдения 2, 4 и 6 мес, измеряли концентрации креатинина (Cr), неорганического фосфата (Pi) и паратиреоидного гормона (PTH), фактора роста фибробластов 23 (FGF23), остеопротегерина (OPG), склеростина (SOST) и Dickkopf-1 (DKK) в сыворотке крови, экспрессию мРНК генов SOST и DKK в почке, альбуминурию (Alb), протеинурию (uTP), фракционную (FEPi) и абсолютную (uPi24) экскрецию Pi. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Экспериментальная модель была сопоставима с 1–2 стадиями ХБП. В группах NE4 и NE6 концентрация sPi и его экскреция почками (FEPi и uPi24) были значительно выше, чем у соответствующего контроля SO4 (p=0,006, p<0,010) и SO6 (p=0,002, p=0,028). Концентрации FGF23 и PTH в сыворотке NE и SO животных достоверно не различались. В группах NE4 и NE6 концентрации SOST и DKK в сыворотке были значительно выше, чем у контроля (p<0,049, p<0,043), при этом экспрессия генов SOST и DKK в NE почке снижалась или не изменялась значительно. Концентрация OPG была выше в группе NE6 при сравнении с SO6 (p=0,028). **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Начальные стадии экспериментальной ХБП характеризует повышение концентраций Dickkopf-1, склеростина, а также остеопротегерина в сыворотке крови. Полученные данные позволяют предполагать возможную роль ингибирования канонического Wnt-сигналинга и редукции обмена кости на ранних стадиях патогенеза нарушений обмена Pi при ХБП.

Ключевые слова: неорганический фосфат, хроническая болезнь почек, костный обмен, почечная экскреция, канонический сигнальный путь Wnt, Dickkopf-1, склеростин, остеопротегерин, фактор роста фибробластов 23, паратиреоидный гормон

Е.О. Bogdanova¹, О.Н. Beresneva¹, И.М. Zubina¹, Г.Т. Ivanova²,
М.М. Parastaeva¹, О.В. Galkina¹, И.Г. Kayukov¹, В.А. Dobronravov^{1*}

INHIBITORS OF CANONICAL WNT SIGNALING PATHWAY AND INORGANIC PHOSPHATE IMBALANCE IN EXPERIMENTAL CHRONIC KIDNEY DISEASE

¹Research Institute of Nephrology, Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia; ²Laboratory of cardiovascular and lymphatic systems, I.P. Pavlov Institute of Physiology Russian Academy of Science, Saint Petersburg, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND. The molecular mechanisms of the initial stages of inorganic phosphate (Pi) metabolic disorders in chronic kidney disease (CKD) remain poorly understood. **THE AIM.** To test the hypothesis about changes in canonical Wnt signaling pathway inhibitors biosynthesis and a concomitant decrease in bone turnover as one of early mechanisms of Pi imbalance in CKD. **MATERIAL AND METHODS.** Creatinine (Cr), inorganic phosphate (Pi), serum parathyroid hormone (PTH), fibroblast growth factor 23 (FGF23), osteoprotegerin (OPG), sclerostin (SOST) and Dickkopf-1 (DKK), renal SOST and DKK mRNA expression, albuminuria (Alb), proteinuria (uTP) levels, fractional (FEPi) and daily (uPi24) Pi excretion were analyzed in SHR rats (N = 52) with 3/4 nephrectomy (NE) or sham operation (SO) and observation periods of 2, 4, and 6 months. **RESULTS.** Experimental

*Добронравов В.А. 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 17, корпус 54. Научно-исследовательский институт нефрологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова. Тел.: +7(812)338-69-01; E-mail: dobronravov@nephrolog.ru. ORCID: 0000-0002-7179-5520

*V.A. Dobronravov. 197022, Russia, St. Petersburg, L. Tolstoy st., 17, build 54. Research Institute of Nephrology, Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University. Phone: +7(812)338-69-01; E-mail: dobronravov@nephrolog.ru. ORCID: 0000-0002-7179-5520

model was comparable with 1-2 stages of CKD. In groups NE4 and NE6, the concentration of sPi and renal Pi excretion (FEPi and uPi24) were significantly higher vs corresponding controls SO4 ($p = 0.006$, $p < 0.010$) and SO6 ($p = 0.002$, $p = 0.028$). Serum concentrations of FGF23 and PTH in NE and SO animals did not change significantly. In NE4 and NE6 groups, serum SOST and DKK concentrations were significantly higher vs controls ($p < 0.049$, $p < 0.043$), while the kidney expression SOST and DKK mRNA in NE rats did not change significantly or decreased ($p = 0.002$, $p < 0.011$). The serum concentration of OPG was higher in the NE6 vs SO6 control ($p = 0.028$). **CONCLUSION.** The initial stages of experimental CKD are characterized by an increase in serum concentrations of Dickkopf-1, sclerostin and osteoprotegerin. The obtained data suggest the possible role of canonical Wnt signaling inhibition and reduction of bone turnover in the pathogenesis of Pi metabolic disorders in early stages of CKD.

Keywords: inorganic phosphate, chronic kidney disease, bone turnover, renal excretion, canonical signaling pathway Wnt, Dickkopf-1, sclerostin, osteoprotegerin, fibroblast growth factor 23, parathyroid hormone

Для цитирования: Богданова Е.О., Береснева О.Н., Зубина И.М., Иванова Г.Т., Парастаева М.М., Галкина О.В., Каюков И.Г., Добронравов В.А. Ингибиторы канонического сигнального пути Wnt и нарушение обмена неорганического фосфата при экспериментальной дисфункции почек. *Нефрология* 2019;23(6):83-91. doi: 10.36485/1561-6274-2019-23-6-83-91

For citation: Bogdanova E.O., Beresneva O.N., Zubina I.M., Ivanova G.T., Parastaeva M.M., Galkina O.V., Kayukov I.G., Dobronravov V.A. Inhibitors of canonical Wnt signaling pathway and inorganic phosphate imbalance in experimental chronic kidney disease. *Nephrology (Saint-Petersburg)* 2019;23(6): 83-91. (In Russ.) doi: 10.36485/1561-6274-2019-23-6-83-91

ВВЕДЕНИЕ

Рост содержания неорганического фосфата (Pi) в клетках и внеклеточном матриксе обладает широким спектром неблагоприятных биологических эффектов. Почечная экскреция Pi является главным механизмом поддержания его гомеостаза в организме. Кроме того, почки занимают важное место в паракринной/эндокринной регуляции обмена Pi, являясь основным местом синтеза кальцитриола и белка α -Klotho (Klotho). При этом открытым остается вопрос о роли непочечных механизмов поддержания нейтрального баланса Pi при хронической болезни почек (ХБП). В частности, представления, ставшие общепринятыми, не учитывают в достаточной мере роль скелета: 1) как органа, способного служить «депо» для существенной доли обменяемого Pi; 2) стратегически регулировать баланс Pi и оказывать системное влияние в результате синтеза секретлируемых белков костного происхождения. При ХБП существенным фактором увеличения общего пула Pi в организме является интестинальная абсорбция, которая при развитии ХБП значительно не меняется, как и экспрессия NaPi- транспортеров в кишечнике [1]. Весьма вероятно, что в условиях стабильного всасывания Pi в кишке на фоне снижения возможностей экскреции Pi почками при ХБП постпрандиальное увеличение Pi в циркуляции приводит к кратковременному «вбросу» и избыточной аккумуляции аниона в кости и мягких тканях [2, 3]. Мы предполагаем, что чем ниже функция почек, тем более выражены этот процесс и его клинико-морфологические проявления со стороны костей и сосудов.

При ХБП ряд событий приводят к снижению костного обмена в связи с необходимостью ингибирования возросшей активности канонического

сигнального пути Wnt (cWnt, canonical wingless/Wg integrated/int-1). Проведенный анализ данных показал, что избыточные активация или депрессия cWnt играют существенную роль в развитии патологических процессов в скелете, сердечно-сосудистой системе и почках [4–9] – органах, имеющих непосредственное отношение к регуляции обмена Pi. cWnt тесно связан с системой костных морфогенетических белков (BMP, bone morphogenic proteins), которая, в частности, имеет значение для дифференцировки мезенхимальных остеопрогениторных клеток и процессов интеграции скелета [10]. Активация cWnt приводит к формированию костной ткани за счет анаболического и анти-катаболического действия, в то время как снижение активности cWnt при дисфункции почек ассоциировано со снижением анаболических процессов в кости [11]. Контррегуляция cWnt осуществляется взаимодействием со специфическими ингибиторами (iWnt) – склеростином (SOST), Dickkopf-1 (DKK), sFRP-4 (секреторный frizzled related protein) [12]. Снижение анаболических процессов скелета при ХБП может являться причиной iWnt-опосредованного снижения активности cWnt. Склеростин преимущественно синтезируется остеocytes и в меньшей степени хондроцитами, как и Dickkopf-1, снижает формирование костной ткани за счет ингибирования терминальной дифференцировки остеобластов и их апоптоза [13]. Склеростин способен образовывать комплекс с рецептором LPR5/6 (low density lipoprotein related protein), препятствовать взаимодействию с лигандами cWnt и трансмембранным рецептором Frizzled, белками Dishevelled и Axin [14]. Нокаут гена *SOST* приводит к патологическому повышению костной массы. Другой ингибитор cWnt – DKK1, как и SOST, способен связываться с LPR6 и блокировать cWnt, по-

мимо этого DKK1 снижает уровень бета-катенина, повышая экспрессию OCT4 (octamer-binding transcription factor 4). Остеопротегерин (OPG) – циркулирующий представитель суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли, синтезируется преимущественно остеобластами. OPG известен как негативный регулятор резорбции костной ткани, действуя как ловушка для RANKL (лиганд рецептора активатора NFκB), препятствует активации RANK (рецептор активатор NFκB), пролиферации и дифференцировке остеокластов. Увеличение его концентрации свидетельствует о снижении костного обмена (при высокой скорости обмена активны и синтез, и резорбция костной ткани). Повышение перечисленных остеогенных факторов в циркуляции, вероятно, имеет системные эффекты в отношении других органов, что может являться основой для патологического взаимодействия почки и костной ткани при формировании дисбаланса неорганического фосфата и развития сосудистой кальцификации [15, 16].

Мы предположили, что: а) увеличение циркулирующих ингибиторов канонического Wnt-сигналинга является ранним событием в патогенезе ретенции Pi на фоне ХБП и б) может быть результатом увеличения их экспрессии в поврежденном органе. Для проверки этой гипотезы показатели обмена Pi были сопоставлены с уровнями классических фосфат-регулирующих гормонов и iWnt в системной циркуляции, а также экспрессией мРНК iWnt в почке в экспериментальных моделях начальных стадий ХБП.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на взрослых самцах крыс линии SHR массой 190–230 г (питомник «Колтуши»). Животных содержали в стандартных условиях вивария Института физиологии им. И.П. Павлова РАН в клетках площадью 0,2 м² по 5 крыс в каждой со свободным доступом к воде. Световой режим контролировался автоматически: 12 ч свет/12 ч темнота; температура в помещении составляла 20–22 °С. Животные ежедневно получали сбалансированный лабораторный корм с содержанием полноценного белка – 20,16%, жиров – 1,18%, углеводов – 85,3%, кальция – 1,03%, фосфата – 0,8% и хлорида натрия – 0,34% по 28–30 г корма на крысу. Суточное потребление белка одним животным, в среднем, составляло 6 г, жиров – 0,35 г, углеводов 25,6 г. В работе применена хирургическая модель ХБП – нефрэктомия (NE) 3/4 [17]. Контролем служили ложнооперированные (SO) крысы SHR с соответствующими сро-

Таблица / Table

Экспериментальные группы Study groups

Модель	Продолжительность наблюдения, мес		
	2	4	6
SO SHR, n	SO2, 8	SO4, 9	SO6, 8
NE SHR, n	NE2, 9	NE4, 10	NE6, 8

Примечание. SO – ложная операция; NE – нефрэктомия; SO – sham operated, NE – nephrectomy.

ками наблюдения, которые составили 2, 4, 6 мес после NE (таблица).

Биохимические исследования

За сутки до выведения из эксперимента крыс помещали в индивидуальные метаболические камеры для сбора мочи на 24 ч в условиях водной депривации. Взятие образцов крови происходило при выведении животных из эксперимента. Кровь и мочу центрифугировали при 1000 g в течение 30 мин. Аликвоты хранили при температуре –80 °С до момента выполнения исследований (не более 6 мес). Концентрацию неорганического фосфата (Pi), креатинина (Cr) в сыворотке крови и моче, уровни альбуминурии и протеинурии (uTP) определяли с использованием реагентов фирмы «Витал Девелопмент Корпорэйшн» (Россия) на биохимическом автоматическом анализаторе «CA-90» («Furuno», Япония). Для измерения концентрации PTH, FGF23, OPG, SOST и DKK в сыворотке крови использовали тест-систему мультипараметрического флюоресцентного анализа MILLIPLEX MAP «Rat Bone Magnetic Bead Panel 1» (Merck, Германия).

ПЦР в реальном времени

Фрагменты почки банкировали в фиксаторе «IntactRNA» для стабилизации РНК в биологических образцах (Евроген, Россия) и хранили при температуре –80 °С до проведения исследований. Из всех образцов была выделена и очищена тотальная РНК («РИБО-зол» и «РИБО-сорб-С», ИнтерЛабСервис, Россия), выполнена обработка очищенной тотальной РНК дезоксирибонуклеазой I (Thermo Scientific, США). Выполнена обратная транскрипция с использованием набора MMLV RT kit (Евроген, Россия). Амплификацию проводили на приборе ICycler (BioRad, США) с использованием готовой смеси qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия). Каждый образец амплифицировали в трех пробирках, содержащих праймеры для склеростина 5'-gcaccatgcagctctcacta-3', 5'-gctgtactcggacagctctt-3' или Dickkopf-1 5'-ctgcatgaggcagcgtatgt-3', 5'-ctgtggcgcagctctgatgat-3' и генов домашнего хозяйства GAPDH 5'-agatggtgaaggtcgtgtg-3', 5'-gatctcgtctcctggaagatg-3', HPRT1 5'-gtt-

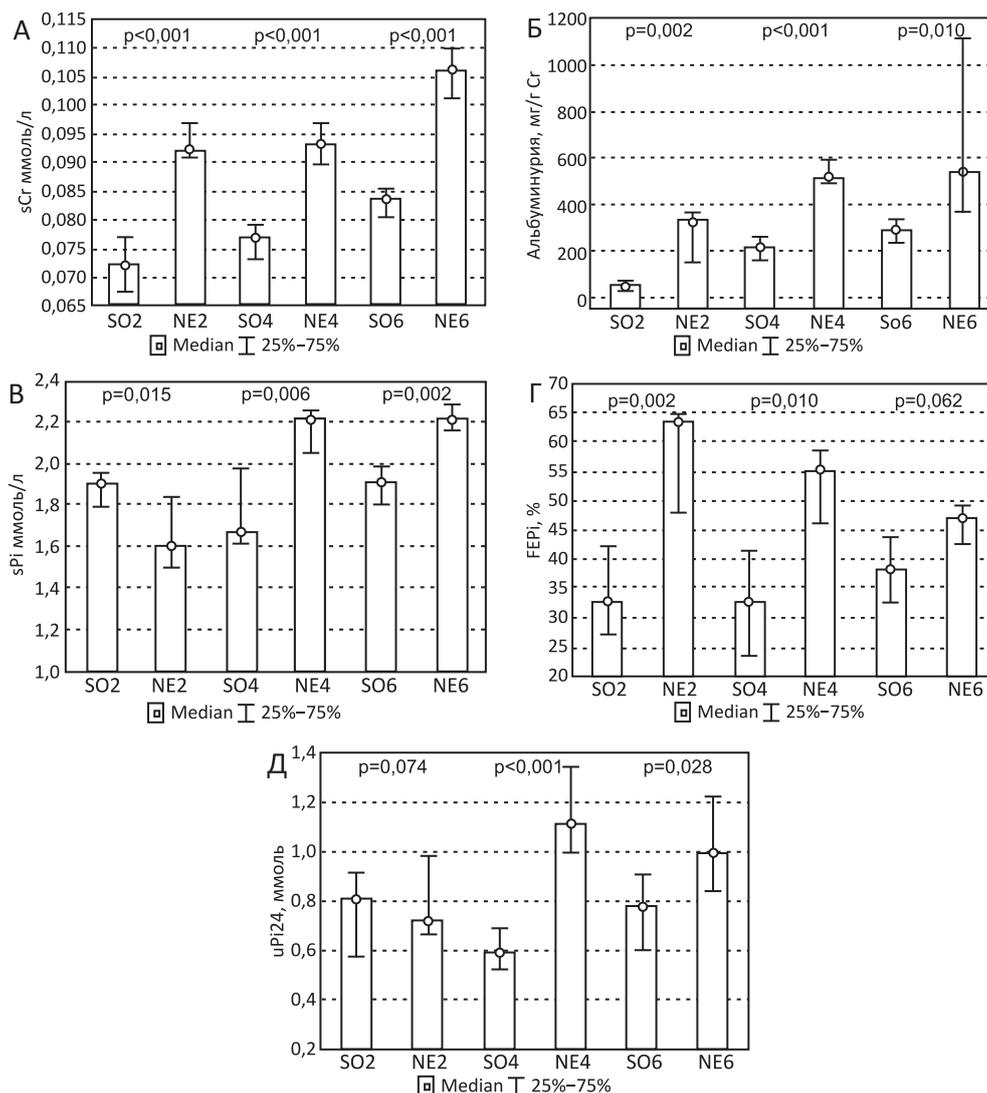


Рисунок 1. Лабораторные показатели функции почек и баланса неорганического фосфата (Pi) в полученных моделях хронической ренальной дисфункции: А – креатинин в сыворотке крови (sCr); Б – альбуминурия; В – Pi в сыворотке крови; Г – фракционная экскреция Pi (FE_{PI}) и Д – абсолютная экскреция Pi (uPi₂₄) почками; SO – ложнооперированные животные; NE – животные с нефрэктомией; на графиках указаны значения p при сравнении SO и NE групп с сопоставимыми сроками наблюдения.

Figure 1. Laboratory tests of kidney function and inorganic phosphate (Pi) balance in experimental renal injury: А – serum creatinine (sCr), В – albuminuria, С – serum Pi, D – fractional excretion of phosphate (FE_{PI}), E – 24-hour urine phosphate excretion (uPi₂₄); SO – sham operated animals, NE – nephrectomized animals; on graphs are p-values for groups SO and NE with comparable observation periods.

ggatacaggccagactt-3', 5'-gccacatcaacaggactctt-3'. Для каждой пары праймеров выполняли оценку эффективности ПЦР. Программа амплификации состояла из начальной денатурации (95 °С, 3 мин) и 40 циклов, включавших денатурацию (94 °С, 20 с), отжиг праймеров и элонгацию (60 °С, 40 с). Экспрессию целевого гена рассчитывали методом ΔΔCt с учетом эффективности ПЦР.

Статистический анализ

Данные представлены как медиана и интерквартильный размах (m, 25%–75%). Для сравнения двух выборок использовали критерий Манна–Уитни, при сравнении большего числа выборок – критерий Краскела–Уоллиса. Межгрупповые

различия и регрессионные коэффициенты считали статистически достоверными при значении p<0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика полученных моделей

Полученные экспериментальные модели хронической дисфункции почек были сопоставимы с ранними стадиями ХБП, поскольку концентрация креатинина в сыворотке крови увеличивалась не более чем на 30% по сравнению с контролем (рис. 1А). Рост уровня альбуминурии соответствовал увеличению сроков экспериментального воздействия (см. рис. 1 Б).

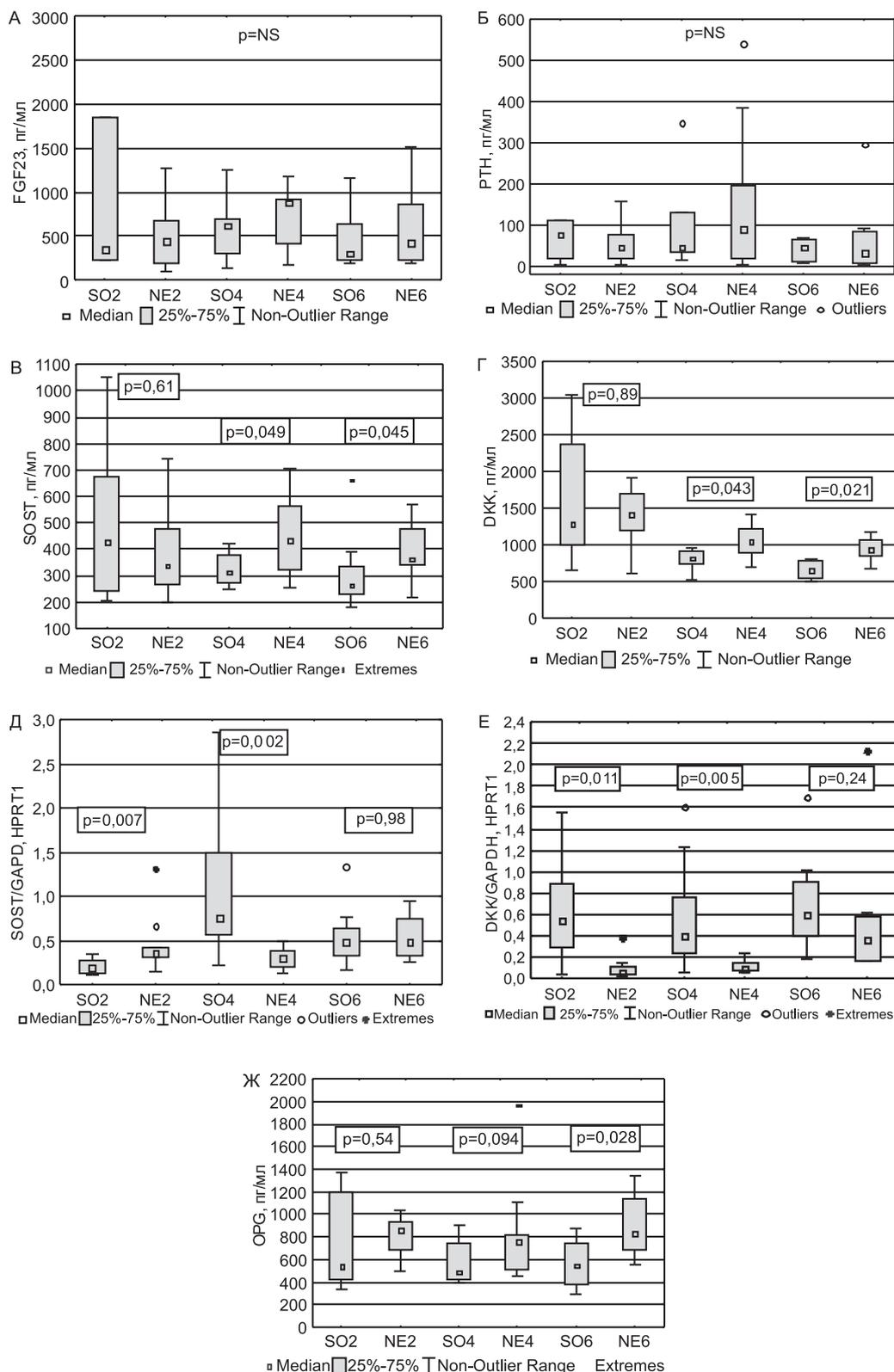


Рисунок 2. Уровни фосфат-регулирующих гормонов и остеогенных факторов: А – концентрация фактора роста фибробластов 23 (FGF23); Б – паратиреоидного гормона (PTH); В – склеростина (SOST); Г – Dickkopf-1 (DKK); Д – нормализованная экспрессия мРНК гена SOST (GAPDH, HPRT1); Е – нормализованная экспрессия мРНК гена DKK (GAPDH, HPRT1); Ж – концентрация остеопротегерина (OPG) в сыворотке крови; на графиках указаны значения р при сравнении SO и NE групп с сопоставимыми сроками наблюдения; NS – различия недостоверны.

Figure 2. Levels of phosphate-regulating hormones and skeletal cell-derived molecules: A – serum concentration of fibroblast growth factor 23 (FGF23), B – parathyroid hormone (PTH), C – sclerostin (SOST), D – Dickkopf-1 (DKK), D - normalized quantitative expression of mRNA SOST (GAPDH, HPRT1), E – normalized quantitative expression of mRNA DKK (GAPDH, HPRT1), F – serum osteoprotegerin (OPG); on graphs are p-values for groups SO and NE with comparable observation periods, NS – not significant.

При сроке наблюдения 2 мес концентрация Pi в сыворотке крови (sPi) несколько снижалась в группе NE2 по сравнению с контролем SO2 (см. рис. 1 В), фракционная экскреция Pi увеличивалась (см. рис. 1 Г), абсолютная экскреция Pi почками значительно не изменялась (см. рис. 1 Д). В группах с продолжительностью эксперимента 4 и 6 мес (NE4 и NE6) достигнут позитивный баланс Pi , о чем свидетельствовало повышение концентрации Pi в сыворотке крови при достоверном повышении индексов мочевой экскреции Pi (см. рис. 1 В–Д).

У животных с NE и SO концентрации FGF23 и PTH в сыворотке крови достоверно не различались (рис. 2 А, Б). Концентрации SOST и DKK в сыворотке были выше у животных с NE и сроками наблюдения 4 и 6 мес по сравнению с соответствующим контролем SO4 и SO6 (см. рис. 2 В, Г). В группе NE6 экспрессия мРНК DKK и SOST была выше, чем в группах с менее выраженным хроническим повреждением почек NE2 и NE4 (DKK: $p < 0,002$, SOST: $p < 0,026$). При сроке экспериментальной ХБП 4 мес почечная экспрессия генов DKK и SOST была значительно ниже по сравнению с контролем, при сроке наблюдения 6 мес не различалась (рис. 2 Е). Сывороточная концентрация OPG была выше у животных в группе NE6 по сравнению с SO6 (см. рис. 2 Ж).

ОБСУЖДЕНИЕ

В постнатальном онтогенезе экспрессия $iWNT$ (SOST и DKK) преимущественно ограничивается скелетом, где SOST синтезируется зрелыми остеоцитами [18], а DKK – зрелыми остеобластами, остеоцитами и мезенхимальными стромальными клетками костного мозга [19]. Ранее мы предположили, что увеличение концентрации SOST и DKK в сыворотке крови при экспериментальной ХБП может отражать процессы изменения баланса клеточных популяций костной ткани в пользу остеоцитов и снижения ее обмена в ответ на задержку Pi вследствие ренальной дисфункции [16]. Последствиями снижения обмена скелета являются смещение распределения и избыточная аккумуляция Pi в мягких тканях и кальцификации [20].

Полученные данные подтверждают гипотезу, положенную в основу исследования, и указывают на то, что повышение циркулирующих ингибиторов канонического сигнального пути Wnt является одним из молекулярных событий при формировании дисбаланса Pi в условиях экспериментальной ХБП. Известно, что при ренальной дисфункции может происходить увеличение образования $iWnt$

в почках и сердечно-сосудистой системе [21, 22]. Есть отдельные наблюдения, предполагающие вклад локального синтеза в почках в системную циркуляцию и их действие на скелет [23–25]. Мы наблюдали увеличение циркулирующих ингибиторов Wnt в группе животных со сроками NE 4 и 6 мес по сравнению с контролем. Вместе с тем, почечная экспрессия мРНК SOST и DKK на тех же сроках эксперимента была снижена или достоверно не различалась. Таким образом, почки, очевидно, не являются существенным источником циркулирующих $iWnt$ в условиях начального повреждения, обусловленного редукцией массы действующих нефронов и системной гипертензией.

Канонический путь Wnt является одним из основных регуляторов клеточных процессов, связанных с определением судьбы клетки и морфогенезом [26]. Активность $sWnt$ во взрослом организме связана с прогрессированием почечного фиброза, сосудистой кальцификацией и адинамической болезнью костей [7, 24, 25]. По некоторым данным ингибирование $sWnt$ является одной из причин снижения пролиферативной активности стволовых клеток эпителия различных органов, а в костной ткани препятствует дифференцировке остеобластов [27]. Предполагают, что основным источником $iWnt$ в кости являются остеоциты [28]. В рамках современных представлений остеоциты являются не только основным участником механотрансдукции [28], но и сенсором изменений системного баланса Pi , и одними из первых реагируют на его ретенцию благодаря их естественной и весьма тесной анатомо-функциональной связи с сосудами и матриксом [29]. Геномные и протеомные исследования последних лет демонстрируют, что Pi является стимулом экспрессии генов клеточной пролиферации, связан с дифференцировкой остеобластов и минерализацией внеклеточного матрикса [30–32]. Для этих процессов важны Na-зависимые Pi транспортеры 3 типа (Pit-1 и Pit-2), которые у млекопитающих также способны выполнять функцию сенсоров Pi [28, 29]. В остеобластах и остеоцитах избыток Pi приводит к синтезу белков семейства SIBLING (small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein) – остеооптина, остеопротегерина, DMP (Dentin matrix acidic phosphoprotein 1), PHEX (Phosphate-regulating neutral endopeptidase, X-linked), связанных с активацией синтеза FGF23 [34]. В остеокластах Pi приводит к снижению экспрессии гена RANKL, супрессии RANK, снижению остеокластогенеза и остеорезорбции [35].

На уровне кости угнетение Wnt-сигналинга может быть одной из причин нарушения регенерации и дифференцировки остеобластов и остеокластов и снижения костного обмена [27]. Косвенным подтверждением изменений клеточных процессов в скелете в этом исследовании было увеличение концентрации OPG – ингибитора остеокластогенеза и остеорезорбции [36].

В примененной модели ранних стадий дисфункции почек (приблизительно соответствующих ХБП 1–3А стадий) увеличение iWnt и OPG происходило в отсутствие каких-либо изменений со стороны PTH и FGF-23. Рост FGF23, синтезируемого, главным образом, остеocytes и зрелыми остеобластами, также характерен для сниженного обмена кости. Активация синтеза FGF23, в первую очередь, происходит при стабильном повышении концентрации P_i в крови на фоне выраженной дисфункции почек [37, 38]. Эти результаты позволяют предполагать, что увеличение образования iWnt с вероятными последствиями в отношении перестройки обмена и минерализации скелета является ранним событием в патогенезе нарушений обмена P_i при ХБП. Циркулирующие iWnt можно рассматривать как кандидатные биомаркеры наиболее ранних эффектов реакции скелета (увеличения популяции остеocytes) на почечную задержку P_i.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в исследовании продемонстрировано повышение концентраций склеростина и Dickkopf-1 при начальной дисфункции почек, которое не связано с изменением ренальной экспрессии генов *SOST* и *DKK1* и опережает ответ со стороны классических фосфат-регулирующих систем – FGF23 и PTH. Полученные данные позволяют предполагать возможную роль ингибирования канонического Wnt-сигналинга и снижения обмена кости в патогенезе дисбаланса P_i на ранних стадиях ХБП.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№18-015-00425).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК REFERENCES

- Schiavi SC, Tang W, Bracken C et al. Npt2b deletion attenuates hyperphosphatemia associated with CKD. *J Am Soc Nephrol* 2012;23:1691–1700. doi: 10.1681/ASN.2011121213
- Takeda E, Yamamoto H, Yamanaka-Okumura H, Taketani Y. Dietary phosphorus in bone health and quality of life. *Nutr Rev* 2012;70:311–321. doi: 10.1111/j.1753-4887.2012.00473
- Karp HJ, Kemi VE, Lamberg-Allardt CJ, Karkkainen MU. Mono- and polyphosphates have similar effects on calcium and phosphorus metabolism in healthy young women. *Eur J Nutr* 2013;52:991–996. doi: 10.1007/s00394-012-0406-5
- Plotkin LI, Mathov I, Aguirre JI et al. Mechanical stimulation prevents osteocyte apoptosis: requirement of integrins, Src kinases and ERKs. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;289:633–C643. doi: 10.1152/ajpcell.00278.2004
- Liu H, Fergusson MM, Castilho RM et al. Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science* 2007;317:803–806. doi: 10.1126/science.1143578
- Gittenberger-de Groot AC, Winter EM, Bartelings MM et al. The arterial and cardiac epicardium in development, disease and repair. *Differentiation* 2012;84(1):41–53. doi: 10.1016/j.diff.2012.05.002
- Mill C, George SJ. Wnt signalling in smooth muscle cells and its role in cardiovascular disorders. *Cardiovasc Res* 2012;95(2):233–240. doi: 10.1093/cvr/cvs141
- Von Gise A, Pu WT. Endocardial and epicardial epithelial to mesenchymal transitions in heart development and disease. *Circ Res* 2012;110(12):1628–1645. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.259960
- Kawakami T, Ren S, Duffield JS. Wnt signalling in kidney diseases: dual roles in renal injury and repair. *J Pathol* 2013;229(2):221–231. doi: 10.1002/path.4121
- Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD et al. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet* 2006;38:1424–1429. doi: 10.1038/ng1916
- Moyses RM, Schiavi SC. Sclerostin, osteocytes, and chronic kidney disease – mineral bone disorder. *Semin Dial* 2015;28(6):578–586. doi:10.1111/sdi.12415
- Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 2008;4(2):68–75. doi: 10.4161/org.4.2.5851
- Compton JT, Lee FY. A Review of Osteocyte Function and the Emerging Importance of Sclerostin. *J Bone Joint Surg Am* 2014;96(19):1659–1668. doi: 10.2106/JBJS.M.01096
- Bafico A, Liu G, Yaniv A et al. Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat Cell Biol* 2001;3(7):683–686. doi: 10.1038/35083081
- Добронравов ВА. Современный взгляд на патофизиологию вторичного гиперпаратиреоза: роль фактора роста фибробластов 23 и Klotho. *Нефрология* 2011;15(4):11–20. doi: 10.24884/1561-6274-2011-15-4-11-20
- Добронравов ВА. Current view on the pathophysiology of secondary hyperparathyroidism: role of fibroblast growth factor 23 and klotho. *Nephrology (Saint-Petersburg)* 2011;15(4):11–20. (In Russ.) doi: 10.24884/1561-6274-2011-15-4-11-20
- Добронравов ВА. Фосфат, почки, кости и сердечно-сосудистая система. *Нефрология* 2016;20(4):10–24
- Добронравов ВА. Phosphate, kidneys, bones and cardiovascular system. *Nephrology (Saint-Petersburg)* 2016;20(4):10–24. (In Russ.)
- Takahashi S, Okada K, Nagura Y et al. Three-quarters nephrectomy in rats as a model of early renal failure. *Nihon Jinzo Gakkai Shi* 1991;33(1):27–31
- Poole KE, van Bezooijen RL, Loveridge N et al. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB Journal* 2005;19:1842–1844. doi: 10.1096/fj.05-4221fj
- Dorit Naot, Usha Bava, Brya Matthews et al. Differential Gene Expression in Cultured Osteoblasts and Bone Marrow Stromal Cells From Patients With Paget's Disease of Bone. *JBMR* 2009. doi: 10.1359/jbmr.061108
- Lu KCh, Wu CC, Yen JF, Liu WCh. Vascular Calcification and Renal Bone Disorders. *The Scientific World Journal* 2014. doi: 10.1155/2014/637065
- Surendran K, Schiavi S, Hruska KA. Wnt-dependent-β-catenin signaling is activated after unilateral ureteral obstruction, and recombinant secreted frizzled-related protein 4 alters the progression of renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:2373–2384. doi: 10.1681/ASN.2004110949
- Zhu D, Mackenzie NC, Millán JL et al. The appearance and modulation of osteocyte marker expression during calcification of

vascular smooth muscle cells. *PLoS One* 2011;6(5):e19595. doi: 10.1371/journal.pone.0019595

23. Koyama S, Tsuruda T, Ideguchi T et al. Osteoprotegerin is secreted into the coronary circulation: a possible association with the renin-angiotensin system and cardiac hypertrophy. *Horm Metab Res* 2014;46(8):581–586. doi: 10.1055/s-0034-1375611

24. Qureshi AR, Olason H, Witas A et al. Increased circulating sclerostin levels in end-stage renal disease predict biopsy-verified vascular medial calcification and coronary artery calcification. *Kidney Int* 2015;88(6):1356–1364. doi: 10.1038/ki.2015.194

25. De Maré A, Maudsley S, Azmi A et al. Sclerostin as Regulatory Molecule in Vascular Media Calcification and the Bone–Vascular Axis. *Toxins (Basel)* 2019;11(7)pii:E428. doi: 10.3390/toxins11070428.

26. van Amerongen R, Nusse R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* 2009;136:3205–3214. doi: 10.1242/dev.033910.

27. Cosin-Roger J, Ortiz-Masià MD, Barrachina MD. Macrophages as an Emerging Source of Wnt Ligands: Relevance in Mucosal Integrity. *Front. Immunol* 2019. doi: 10.3389/fimmu.2019.02297

28. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J of Bone and Mineral Res* 2011;26(2):229–238. doi: 10.1002/jbmr.320

29. Chande S, Bergwitz C. Role of phosphate sensing in bone and mineral metabolism. *Nature Reviews Endocrinology* 2018;14:637–655. doi: 10.1038/s41574-018-0076-3

30. Conrads KA, Yu LR, Lucas DA et al. Quantitative proteomic analysis of inorganic phosphate-induced murine MC3T3-E1 osteoblast cells. *Electrophoresis* 2004;25(9):1342–1352. doi: 10.1002/elps.200405892

31. Conrads KA, Yi M, Simpson KA et al. A combined proteome and microarray investigation of inorganic phosphate-induced pre-osteoblast cells. *Mol Cell Proteomics* 2005;4(9):1284–1296. doi: 10.1074/mcp.M500082-MCP200

32. Pesta DH, Tsigotis DN, Befroy DE et al. Hypophosphatemia promotes lower rates of muscle ATP synthesis. *FASEB J* 2016;30(10):3378–3387. doi: 10.1096/fj.201600473R

33. Beck L, Leroy C, Salaün C et al. Identification of a novel function of PiT1 critical for cell proliferation and independent of its phosphate transport activity. *J Biol Chem* 2009;284(45):31363–74. doi: 10.1074/jbc.M109.053132.

34. Chavkin NW, Chia JJ, Crouthamel MH, Giachelli CM. Phosphate uptake-independent signaling functions of the type III sodium-dependent phosphate transporter, PiT-1, in vascular smooth muscle cells. *Exp Cell Res* 2015;333(1):39–48. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.02.002

35. Kanatani M, Sugimoto T, Kano J et al. Effect of high phosphate concentration on osteoclast differentiation as well as bone-resorbing activity. *J Cell Physiol* 2003;196(1):180–189. doi: 10.1002/jcp.10270

36. Kang JH, Ko HM, Moon JS et al. Osteoprotegerin Expressed by Osteoclasts An Autoregulator of Osteoclastogenesis. *J Dent Res* 2014;93(11):1116–1123. doi: 10.1177/0022034514552677

37. Добронравов ВА, Богданова ЕО, Семенова НЮ и др. Почечная экспрессия белка aKlotho, фактор роста фибробластов 23 и паратиреоидный гормон при экспериментальном моделировании ранних стадий хронического повреждения почек. *Нефрология* 2014;18(2):72–78

Dobronravov VA, Bogdanova EO, Semenova NY et al. Renal aKlotho expression, fibroblast growth factor 23 and parathyroid hormone in experimental modeling of early stages of chronic kidney injury. *Nephrology (Saint-Petersburg)* 2014;18(2):72–78. (In Russ.)

38. Богданова ЕО, Галкина ОВ, Зубина ИМ, Добронравов ВА. Klotho, фактор роста фибробластов 23 и неорганический фосфат на ранних стадиях хронической болезни почек. *Нефрология* 2016;20(4):54–61

Bogdanova EO, Galkina OV, Zubina IM, Dobronravov VA. Klotho, fibroblast growth factor 23 and inorganic phosphate in early stages of chronic kidney disease. *Nephrology (Saint-Petersburg)* 2016;20(4):54–61. (In Russ.)

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. The authors declare no conflict of interest.

Сведения об авторах:

Богданова Евдокия Олеговна, канд. биол. наук 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 17, корп. 54. Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Научно-исследовательский институт нефрологии, лаборатория биохимического гомеостаза, мл. научн. сотр. Тел.: +7(812)338-69-31; E-mail: evdokia.bogdanova@gmail.com. ORCID: 0000-0003-1969-1959

Береснева Ольга Николаевна, канд. биол. наук 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 17, корп. 54. Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Научно-исследовательский институт нефрологии, лаборатория клинической физиологии почек, ст. научн. сотр. Тел.: +7(812)346-39-26; E-mail: beresnevaolga@list.ru. ORCID: 0000-0002-7532-2405

Зубина Ирина Михайловна, канд. биол. наук 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 17. Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Научно-исследовательский институт нефрологии, лаборатория биохимического гомеостаза. Тел.: +7(812)338-69-01; E-mail: zubina@list.ru

Иванова Галина Тажимовна, канд. биол. наук 199034, Россия, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6. Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, лаборатория физиологии сердечно-сосудистой и лимфатической систем, ст. научн. сотр. Тел.: +7(812)328-07-01; E-mail: tazhim@list.ru

Парастаева Марина Магрезовна, канд. биол. наук 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 17, корп. 54. Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Научно-исследовательский институт нефрологии, лаборатория клинической физиологии почек, ст. научн. сотр. Тел.: +7(812)346-39-26; E-mail: parastaeva@list.ru

Галкина Ольга Владимировна, канд. биол. наук 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 17. Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Научно-исследовательский институт нефрологии, заведующая лабораторией биохимического гомеостаза. Тел.: +7(812)338-69-01; E-mail: ovgalkina@mail.ru. ORCID: 0000-0001-7265-7392

Проф. Каюков Иван Глебович, д-р мед. наук 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 17, корп. 54. Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Научно-исследовательский институт нефрологии, руководитель лаборатории клинической физиологии почек. Тел.: +7(981)815-39-49; E-mail: kvaka55@mail.ru. ORCID: 0000-0003-0793-5629

Проф. Добронравов Владимир Александрович, д-р мед. наук 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 17, корп. 54. Первый Санкт-Петербургский государственный

медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, заместитель директора Научно-исследовательского института нефрологии по научной работе. Тел.: +7(812)338-69-01; E-mail: dobronravov@nephrolog.ru. ORCID: 0000-0002-7179-5520

About the authors:

Evdokia O. Bogdanova, PhD

Affiliations: 197022, Russia, St. Petersburg, L. Tolstoy st., 17, build. 54. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Research Institute of Nephrology, Laboratory of Biochemical Homeostasis. Phone: +7(812)338-69-31; E-mail: evdokia.bogdanova@gmail.com. ORCID: 0000-0003-1969-1959

Olga N. Beresneva, PhD, senior researcher

Affiliations: 197022, Russia, St. Petersburg, L. Tolstoy st., 17, build 54. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Research Institute of Nephrology, Laboratory of Clinical Physiology of the Kidney. Phone: +7(812)346-39-26; E-mail: beresnevaolga@list.ru. ORCID: 0000-0002-7532-2405

Irina M. Zubina, PhD in Biology

Affiliations: 197022, Russia, St. Petersburg, L. Tolstoy st., 17, build 54. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Research Institute of Nephrology, Laboratory of Biochemical Homeostasis. Phone: +7(812)338-69-01; E-mail: zubina@list.ru

Galina T. Ivanova, PhD, senior researcher

Affiliation: 199034, Russia, St. Petersburg, Makarova Emb., 6, I.P. Pavlov Institute of Physiology Russian Academy of Sciences, Laboratory of physiology of cardiovascular and lymphatic systems. Phone: +7(812)328-07-01; E-mail: tazhim@list.ru

Marina M. Parastaeva, PhD, senior researcher

Affiliations: 197022, Russia, St. Petersburg, L. Tolstoy st., 17, build 54. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Research Institute of Nephrology, Laboratory of Clinical Physiology of the Kidney. Phone: +7(812)346-39-26; E-mail: parastaeva@list.ru

Olga V. Galkina, PhD in Biology

Affiliations: 197022, Russia, St. Petersburg, L. Tolstoy st., 17, build 54. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Research Institute of Nephrology, Head of The Laboratory of Biochemical Homeostasis. Phone: +7(812)338-69-01; E-mail: ovgalkina@mail.ru. ORCID: 0000-0001-7265-7392

Prof. Ivan G. Kayukov, MD, PhD, DMedSci

Affiliations: 197022, Russia, St. Petersburg, L. Tolstoy st., 17, build 54. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Research Institute of Nephrology, Head of The Laboratory of Clinical Physiology of the Kidney. Phone: +7(981)815-39-49; E-mail: kvaka55@mail.ru. ORCID: 0000-0003-0793-5629

Prof. Vladimir A. Dobronravov, MD, PhD, DMedSci

Affiliations: 197022, Russia, St. Petersburg, L. Tolstoy st., 17, build 54. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Research Institute of Nephrology, Vice-Director. Phone: +7(812)338-69-01; E-mail: dobronravov@nephrolog.ru. ORCID: 0000-0002-7179-5520

Поступила в редакцию: 30.07.2019

Принята в печать: 06.11.2019

Article received: 30.07.2019

Accepted for publication: 06.11.2019