ISSN 1561-6274. Нефрология. 2014. Том 18. №2.

© В.А.Добронравов, Е.О.Богданова, Н.Ю.Семенова, О.Н.Береснева, М.М.Парастаева, О.В.Галкина, И.М.Зубина, Е.Е.Зуева, Г.Т.Иванова, И.Г.Каюков, Т.Л.Коваленко, Л.В.Котенко, Г.М.Нутфуллина, В.Г.Сиповский, В.А.Цинзерлинг, А.В.Смирнов, 2014
УДК [616.61-001-036.12:577.126+612.433.431]:61.001.57

В.А. Добронравов[1], Е.О. Богданова[1], Н.Ю. Семенова[5], О.Н. Береснева[1], М.М. Парастаева[1], О.В. Галкина[1], И.М. Зубина[1], Е.Е. Зуева[3], Г.Т. Иванова[1], И.Г. Каюков[1], Т.Л. Коваленко[3], Л.В. Котенко[3], Г.М. Нутфуллина[2], В.Г. Сиповский[1], В.А. Цинзерлинг[4], А.В. Смирнов[1]

ПОЧЕЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА αKLOTHO, ФАКТОР РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ 23 И ПАРАТИРЕОИДНЫЙ ГОРМОН ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ РАННИХ СТАДИЙ ХРОНИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК

V.A. Dobronravov, E.O. Bogdanova, N.Yu. Semenova, O.N. Beresneva, M.M. Parastaeva, O.V. Galkina, I.M. Zubina, E.E. Zueva, G.T. Ivanova, I.G. Kaukov, T.L. Kovalenko, L.V. Kotenko, G.M. Nuftullina, V.G. Sipovsky, V.A. Zinserling, A.V. Smirnov

RENAL αKLOTHO EXPRESSION, FIBROBLAST GROWTH FACTOR 23 AND PARATHYROID HORMONE IN EXPERIMENTAL MODELING OF EARLY STAGES OF CHRONIC KIDNEY INJURY

[1]Научно-исследовательский институт нефрологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, [2]кафедра патологической анатомии и [3]центр лабораторной диагностики Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, [4]лаборатория патоморфологии Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии, [5]лаборатории по изучению лейкозов Российского научно-исследовательского института гематологии и трансфузиологии, Россия.

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Определить направленность изменений экспрессии белка αKlotho, фактора роста фибробластов 23 (FGF23), интактного паратиреоидного гормона (PTH) и параметров обмена неорганического фосфата (Pi) в экспериментальных моделях ранних стадий дисфункции почек. *МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ*. Для моделирования хронического повреждения почек выполняли резекцию 3/4 и 5/6 почек у крыс линии SHR, сроки эксперимента – 1 и 2 мес. Контрольные группы составили ложнооперированные животные. Определяли показатели мочевой экскреции неорганического фосфата (Pi). Экспрессию αKlotho в тубулярном эпителии оценивали иммуногистохимически. Концентрации FGF23 и PTH в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа. *РЕЗУЛЬТАТЫ*. Реализованные модели соответствовали клиническим стадиям 1-3 хронической болезни почек. Почечная экскреция Pi достоверно увеличивалась в группах животных, подвергнутых нефрэктомии. Концентрации PTH в контрольных и опытных группах достоверно не отличались, вне зависимости от сроков и характера воздействия. Не выявлено достоверных изменений концентрации FGF23 и PTH в сыворотке крови по мере нарастания степени повреждения почек и увеличения экскреции фосфата с мочой. Достоверное увеличение FGF23 выявлено только в экспериментальной модели 5/6 нефрэктомии. Уровень тканевой экспрессии αKlotho был достоверно ниже в экспериментальных моделях 3/4 и 5/6 нефрэктомий с различными сроками эксперимента по сравнению с контролем. Кроме того, существенное снижение αKlotho выявлено на самых ранних стадиях повреждения почек (группа ложнооперированных крыс SHR через 2 мес) в сравнении с контролем. *ЗАКЛЮЧЕНИЕ*. Изменения в системе FGF23/αKlotho существенно опережают развитие вторичного гиперпаратиреоза; на ранних стадиях хронического повреждения редукция αKlotho в почке является первичным событием по отношению к системному повышению FGF23; увеличение относительной и абсолютной экскреции фосфатов на ранних стадиях экспериментальной ХБП происходят независимо от αKlotho, FGF23 и PTH.

Ключевые слова: αKlotho, фактор роста фибробластов 23, паратиреоидный гормон, экспериментальное моделирование, хроническое повреждение почек, хроническая болезнь почек, неорганический фосфат, мочевая экскреция.

Добронравов В.А. 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Л.Толстого, д. 17. Научно-исследовательский институт нефрологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, e-mail: dobronravov@nephrolog.ru, тел/факс: +7(812)234-66-56.

ABSTRACT
THE AIM. To determine changes of αKlotho protein kidney expression, circulating levels of fibroblast growth factor 23 (FGF23) and intact parathyroid hormone (PTH) and the parameters of inorganic phosphate (Pi) exchange in experimental modeling of early stages of chronic kidney disease. *MATERIAL AND METHODS.* The experimental models the chronic kidney injury were 3/4 or 5/6 nephrectomy (NE) in SHR rats while sham-operated SHR rats served as control groups. The duration of experiments was 1 or 2 months. The indices of Pi urinary excretion were determined as well as renal αKlotho protein expression by immunohistochemistry, serum concentrations of FGF23 and PTH (by enzyme-linked immunosorbent assay). *RESULTS.* The implemented models corresponded to 1C-3C stages of chronic kidney disease. Renal excretion of Pi was significantly increased in the groups of nephrectomized animals. No significant differences were observed in the serum concentration of FGF23 and PTH between control and experimental groups. FGF23 levels were significantly higher only in model of 5/6NE in compare to control groups. In contrary, the renal expression of αKlotho protein was significantly lower in all experimental models of 3/4NE, 5/6 NE compared to the control (sham-operated SHR, 1 month). Moreover, a significant reduction of αKlotho protein was identified at the earliest stage of kidney damage among models applied that was sham-operated SHR, 2 months (vs. sham-operated SHR, 1 month). *CONCLUSION*. Changes in FGF23/αKlotho system preceeds development of secondary hyperparathyroidism; in early stages of chronic kidney injury the reduction αKlotho in kidney occurs earlier than the systemic increase of FGF23; increase of relative and absolute phosphate excretion in the early stages of experimental CKD is independent from αKlotho, FGF23 and PTH.

Key words: Key words: αKlotho, fibroblast growth factor 23, parathyroid hormone, experimental modeling, chronic kidney injury, chronic kidney disease, inorganic phosphate, urinary excretion.

ВВЕДЕНИЕ

Неорганический фосфат является существенным компонентом клеточного метаболизма, а его повышение отчетливо связано с увеличением рисков смерти у пациентов с хронической болезнью почек (ХБП) [1]. Согласно современным представлениям, основными регуляторами кальций-фосфатного метаболизма считаются PTH, кальцитриол и FGF23, биологическое действие которого осуществляется в присутствии трансмембранного белка αKlotho [2–6]. Нарушение сигнального пути FGF23/αKlotho закономерно происходит при прогрессировании ХБП и проявляется в снижении экспрессии белка αKlotho в почке и повышении FGF23 в циркуляции [7–9]. Установлено, что рост концентрации FGF23 является первичным событием по отношению к PTH, существенно опережая повышение последнего [10]. Есть предположения, что повышение уровня FGF23 при ХБП возникает или а) в ответ на ретенцию Pi, связанную с нарушением его экскреции, или б) в связи со снижением экспрессии αKlotho в канальцах почки, приводящим к формированию резистентности органа к воздействию FGF23 [9, 11].

Настоящее исследование предпринято с целью проверки гипотезы о первичном снижении экспрессии белка αKlotho в почке в ответ на повреждение с последующим нарушением экскреции Pi и повышением FGF23.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальное моделирование

Исследование выполнено на взрослых самцах крыс линии SHR (питомник «Колтуши» РАН) с массой тела 190–230 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Для создания экспериментальной дисфункции почек применяли модели 3/4 нефрэктомии (NE) [12] или 5/6 NE [13, 14]. В работе было использовано три модели хронического повреждения почек, каждую из которых подразделяли в зависимости от сроков проведения эксперимента (таблица).

Модели хронического повреждения почек и сроки эксперимента*

	Сроки воздействия	
Описание модели	1 мес	2 мес
SHR, контроль	n=9 [SHR(1)]	n=9 [SHR(2)]
SHR, нефрэктомия 3/4	n=9 [3/4NE(1)]	n=9 [3/4NE(2)]
SHR, нефрэктомия 5/6	n=9 [5/6NE(1)]	n=9 [5/6NE(2)]

* В скобках указано сокращенное обозначение группы, далее используемое в тексте.

В ходе эксперимента животных содержали на стандартном лабораторном пищевом рационе с содержанием фосфатов 0,8% и свободном доступе к воде. Через 1 или 2 мес животных выводили из эксперимента, забирали образцы крови и почки для последующего исследования. Накануне выведения из эксперимента животных помещали в метаболические камеры на 24 ч и собирали суточную мочу. Образцы сыворотки крови центрифугировали при 1000 g в течение 30 мин, аликвоты и образцы мочи хранили при температуре –80 ºС до момента проведения исследования.

Эксперименты проводили в соответствии с требованиями по работе с лабораторными животными после одобрения Локальным Этическим комитетом.

Гистологические исследования

Для светооптической микроскопии паренхиму (1–2 мм) из срединной части левой почки фиксировали в 5% формалине, приготовленном на PBS

(pH 7,2), при комнатной температуре в течение 16 ч. Срезы толщиной не более 5 мкм изготовляли с применением ротационного микротома «Accucut SRM» («Sakura Finetek», Inc., США). Срезы помещали на стекло с полилизиновым покрытием, высушивали в термостате при 37 ºС в течение 12 ч, затем депарафинировали, гидратировали и производили демаскировку антигена согласно стандартной методике. Эндогенную пероксидазную активность ликвидировали инкубацией в течение 6 мин в растворе, блокирующем пероксидазу («Spring Bioscience», США). Неспецифичное связывание антител блокировали 10 мин реагентом «Background Blocker» («DBS», США). Первичные поликлональные кроличьи антитела против человеческого белка αKlotho использовали в разведении 1:250 («Abcam», Великобритания). Для визуализации результатов применяли систему REVEAL-Biotin-Free Polyvalent DAB («Spring Bioscience», США). В качестве негативного контроля использовали срезы, инкубированные с TBS-буфером вместо первичных антител. После проведения ИГХ препараты подкрашивали гематоксилином, дегидратировали в спиртах, просветляли в ксилоле и заключали в среду Био Маунт («Bio-Optica», Италия). Для проведения морфометрического анализа применяли аппаратно-программный комплекс «ВидеоТесТ-Морфология» (программное обеспечение ВидеоТесТ-Морфология 5.2). Оценивали среднюю долю площади специфического продукта ИГХ-реакции от общей площади тубулоинтерстиция по 10 полям зрения (ув х40).

Иммуноферментный анализ и биохимические исследования

Измерение концентрации FGF23 в сыворотке крови проводили при помощи тест-системы «FGF23 ELISA Kit» (Kainos Laboratories, Inc., Япония). Концентрацию интактного PTH в крови измеряли при помощи тест-системы «Rat Intact PTH ELISA Kit» (Immutopics, Inc., США). Контроль качества результатов ИФА производили при помощи внутренних контрольных материалов, предусмотренных тест-системами. Визуализацию результатов иммуноферментного анализа проводили на полуавтоматическом иммуноферментном микропланшетном анализаторе «ImmunoChem 2100» («High Technology», США). Для построения калибровочной кривой и расчета результатов иммуноферментного анализа применяли программное обеспечение «SoftMax® Pro» («Molecular Devices, Inc.», США).

Концентрации Pi, креатинина в сыворотке крови и моче, а также протеинурию определяли с помощью стандартных методик на автоматическом анализаторе SYNCHRON CX DELTA («Beckman coulter», США).

Расчет фракционной экскреции неорганического фосфата осуществляли по формуле: FEPi (%)= (UPi x SCr)/(SPi x UCr) x 100, где UPi – концентрация фосфора в моче, SPi – концентрация фосфора в сыворотке, UCr – концентрация креатинина в моче, SCr – концентрация креатинина в сыворотке.

Абсолютную экскрецию фосфатов (UPi24) рассчитывали по формуле:

UPi24 (ммоль) = UPi x D, где UPi – концентрация фосфора в моче, D – диурез за 24 ч.

Статистический анализ

Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Сравнение средних значений в двух выборках проводили при помощи непараметрических критериев Манна–Уитни, Вальда–Вольфовитца. Для множественных сравнений применяли тест Краскала–Уоллиса. Критический уровень значимости различий показателей для всех статистических тестов принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

По мере увеличения тяжести и времени экспозиции хронического повреждения почек в экспериментальных условиях выявлены закономерные изменения уровня креатининемии и протеинурии (рис.1). Имел место достоверный тренд увеличения креатининемии (p_{anova}<0,001), хотя этот показатель был далек от «азотемических» значений. Относительный прирост креатинина в опытных группах по сравнению с контрольными составил не более 50%, а реализованные модели приблизительно со-

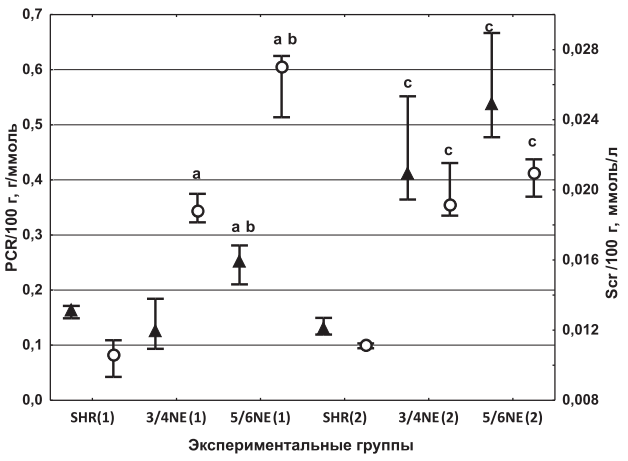

Рис.1. Уровень креатинина сыворотки крови (круги) и суточной мочевой экскреции белка (треугольники) в группах экспериментальных животных [a – p<0,001 в сравнении с SHR(1); b – p≤0,004 в сравнении с 3/4NE(1); c – p≤0,001 в сравнении с SHR(2)].

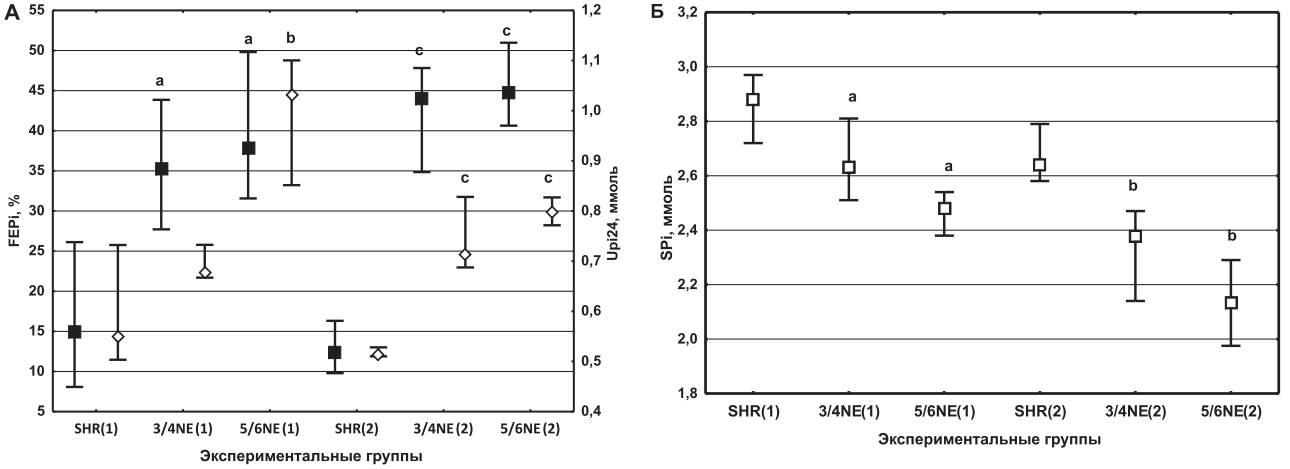

Рис. 2. А. Фракционная экскреция неорганического фосфата (FEPi – ромбы) и абсолютная мочевая экскреция фосфата (UPi24 – квадраты) в группах экспериментальных животных [a – p=0,019 в сравнении с SHR(1); b – p≤0,001 в сравнении с SHR(1) и 3/4NE(1); c – p≤0,001 в сравнении с SHR(2)]. Б. Концентрации SPi в группах экспериментальных животных [a – p≤0,03 в сравнении с SHR(1); b – p≤0,001 в сравнении с SHR(2)].

ответствовали клиническим стадиям хронической болезни почек 1С-3С (см. рис. 1).

Фракционная экскреция неорганического фосфата (FEPi) и абсолютная экскреции Pi с мочой достоверно увеличивались в группах животных, подвергнутых нефрэктомии по сравнению с контрольными группами (рис. 2,А). Эти изменения сопровождались достоверным снижением SPi (рис. 2,Б).

Концентрации PTH достоверно не отличались как при сравнении групп животных с одинаковыми сроками экспозиции воздействия, так и всех групп в целом (p_{anova}=0,2, рис. 3).

Была выявлена тенденция к увеличению FGF23 по мере усугубления тяжести повреждения (p_{anova}=0,062, см. рис. 3). Достоверно более высокие уровни FGF23 выявлены только в группе 5/6 NE(2) при попарном сравнении с группами SHR(2) и SHR(1) (см. рис. 3).

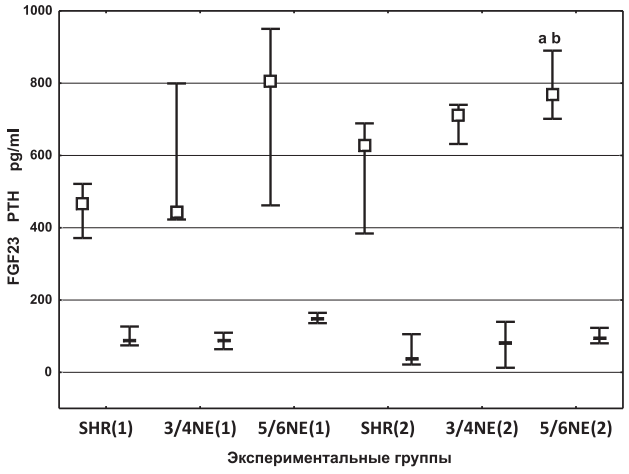

Рис. 3. Фактор роста фибробластов 23 (FGF23) и интактный паратиреоидный гормон (PTH) в циркуляции в группах экспериментальных животных [a – p=0,008 в сравнении с SHR(2); b – p=0,02 в сравнении с SHR(1); другие межгрупповые различия недостоверны].

В то же время, изменения αKlotho были гораздо более отчетливыми (рис. 4–5).

Экспрессия белка αKlotho в почке достоверно снижалась по мере нарастания степени их повреждения (p_{anova} = 0,001, см. рис. 5). Интересно, что экспрессия αKlotho была ниже в группе SHR(2) по сравнению с SHR(1). Экспрессия αKlotho достоверно не отличалась в моделях 3/4 NE с различными сроками эксперимента, но была ниже в группе животных 5/6 NE(2) по сравнению с 5/6 NE(1).

ОБСУЖДЕНИЕ

В представляемом исследовании удалось моделировать ранние стадии хронического повреждения почек различной степени выраженности и исследовать изменения PTH, FGF23, αKlotho в ходе прогрессирования патологического процесса.

Примененные подходы позволили достичь ранних стадий хронической дисфункции почек, приблизительно соответствующих ХБП С1–С3а. Несмотря на достоверный тренд увеличения креатининемии, этот показатель был далек от значений, соответствующих азотемии. Адекватность примененного экспериментального моделирования также подтверждена закономерными для прогрессирующей дисфункции почек изменениями мочевой экскреции Pi. Экскретируемая фракция и абсолютная экскреция Pi с мочой увеличивались, а концентрация Pi в сыворотке крови снижалась в группах животных, подвергнутых NE, по сравнению с контрольными группами ложнооперированных животных. Такие изменения определенно

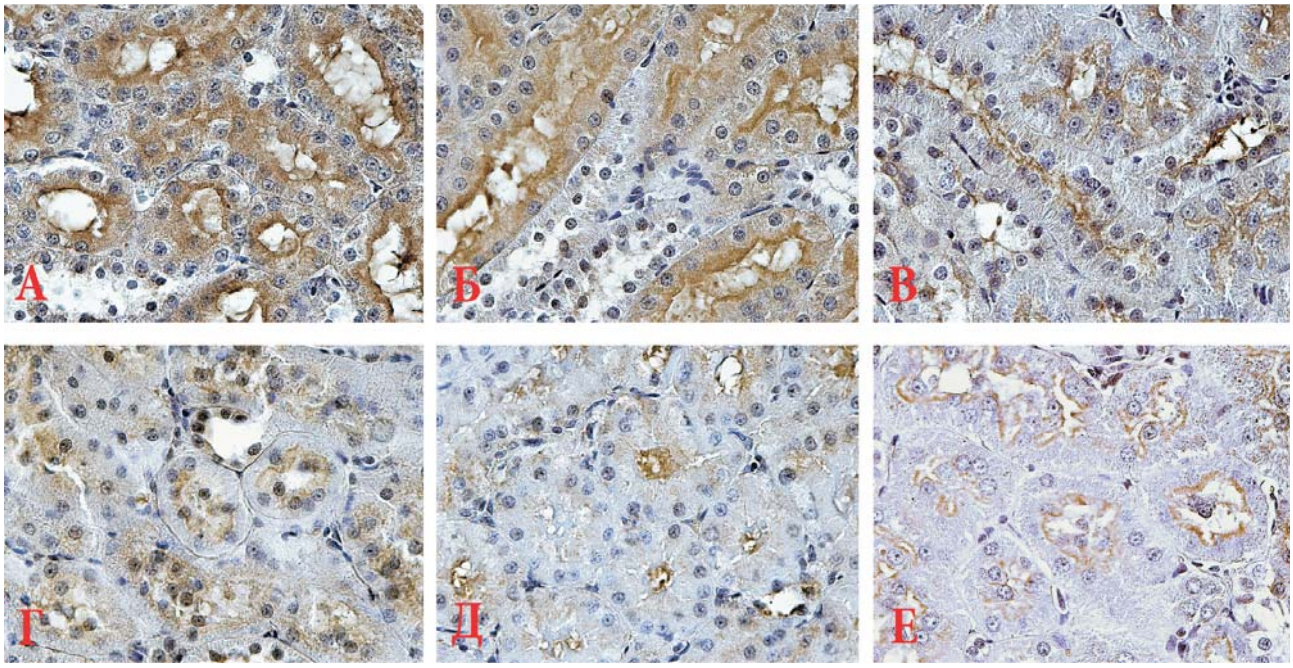

Рис. 4. Репрезентативные микрофотографии экспрессии αKlotho (продукт реакции коричневого цвета) в почке в контрольных и экспериментальных группах: А – SHR, 1 мес; Б – SHR, ¾ нефрэктомия, 1 мес; В – SHR, 5/6 нефрэктомия, 1 мес; Г – SHR, 2 мес; Д – SHR, ¾ нефрэктомия, 2 мес; Е – SHR, 5/6 нефрэктомия, 2 мес (ув. х40).

отражают почечные фосфотонические эффекты, предположительно возникающие в ответ на ретенцию Pi вследствие начального снижения клубочковой фильтрации [3].

В соответствии с современными представлениями основным фосфотонином, начинающим противодействовать системной ретенции Pi, считается FGF23. Хорошо известно, что повышение FGF23 происходит по мере снижения функции почек, становится отчетливым при достаточно выраженной дисфункции почек (СКФ<60 мл/мин) [15–18], предшествует реакции со стороны PTH [10]. FGF23 при прогрессировании ХБП стимулирует фосфатурию, снижая экспрессию натрий-фосфатных транспортеров, Npt2a, Npt2c в проксимальных канальцах почки. С другой стороны – FGF23 в результате модуляции активности энзимов Cyp24a1 и Cyp27b1 приводит к системному снижению кальцитриола и, в свою очередь, к ослаблению геномного контроля PTH и повышению его концентрации в крови [7, 19]. Известно также о значительном снижении образования αKlotho (ко-рецептора FGF23, определяющего его фосфотонический эффект) в почках при выраженных стадиях ХБП [20–23].

До сих пор открытым остается вопрос о том, что именно является причиной роста концентрации FGF23 в циркуляции на *ранних стадиях* ХБП. Существуют две основные (но не единственные) гипотезы: а) причиной увеличения образования FGF23 является первичная ретенция фосфатов при снижении количества функционирующих нефронов; б) рост FGF23 связан с развитием резистентности почки к его воздействию из-за снижения экспрессии αKlotho на фоне ренального повреждения.

В пользу последней версии свидетельствуют полученные данные о наличии только недостоверного тренда в сторону повышения концентрации FGF23 крови по мере снижения функции почек и явного увеличения показателей мочевой экскреции Pi. Достоверное повышение FGF23 выявлено только в модели 5/6 NE(2), приблизительно соответствующей ХБП С3а у людей. Напротив, экспрессия белка αKlotho в почке отчетливо снижалась по мере нарастания степени повреждения почек. Это было очевидно в моделях NE, однако интересно, что нам удалось документировать достоверное снижение αKlotho даже у ложнооперированных животных, у которых фактором повреждения почек на протяжении 2 мес была *только* системная артериальная гипертензия [группа SHR(2) vs SHR(1)]. Подобные данные могут указывать на αKlotho как на маркер ренального повреждения и фактор, связанный с его прогрессированием [23].

Полученные данные определенно указывают на первичность изменений экспрессии протеина αKlotho, однако не подтверждают гипотезу о причинно-следственной связи между снижением αKlotho и последующим ростом FGF23, как результата формирования резистентности почки к действию последнего.

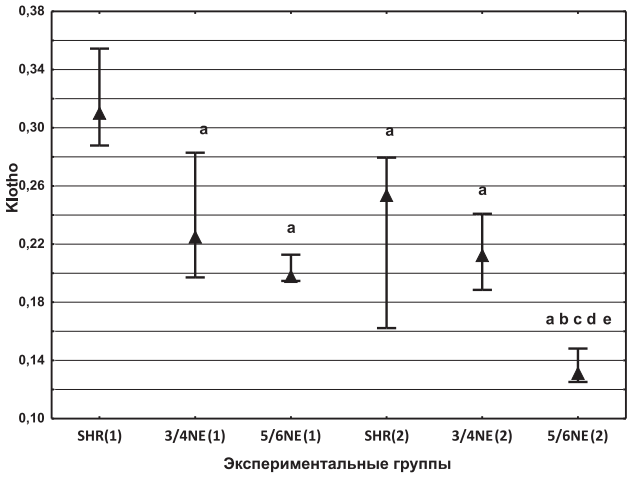

Рис. 5. Количественная морфометрия результатов иммуногистохимического исследования экспрессии белка αKlotho в почке (ордината указывает долю тубулоинтерстиция с продуктом ИГХ-реакции на αKlotho): a – p≤0,02 в сравнении с SHR(1); b – p<0,001 в сравнении с 3/4 NE(1); c – p=0,007 в сравнении с 5/6 NE(1); d – p=0,012 в сравнении с SHR(2); e – p<0,001 в сравнении с 3/4 NE(2) (другие межгрупповые различия недостоверны).

Результаты представляемого исследования в целом подтвердили другие наблюдения о снижении αKlotho в почке при ее повреждении [20, 23, 24] и впервые указали на возможность редукции αKlotho на самых ранних стадиях ХБП в эксперименте. В отличие от результатов других исследований полученные данные также позволили сопоставить динамику αKlotho, FGF23 и PTH. Ранее M.S. Moe и соавт. [24] получили данные о повышении системной концентрации FGF23 и снижении экспрессии мРНК αKlotho в почках при хроническом повреждении, но дизайн исследования не позволял определить, какое из событий происходило первым. Недавно, D. Spichtig и соавт. [25] опубликовали данные о росте концентрации FGF23 параллельно с ростом концентрации PTH, предшествовавшем достоверному снижению экспрессии мРНК αKlotho в почке. В цитируемых работах специфической моделью хронического повреждения были крысы линии Cy/+ с кистозными изменениями почек, а вопрос о сопоставимости применяемых разными авторами моделей ХБП остается открытым.

Не менее важной находкой этого исследования является то, что изменения αKlotho при отсутствии реакции со стороны PTH и FGF23 *не привели* к ожидаемым изменениям мочевой экскреции Pi. αKlotho обладает FGF23-опосредованным и самостоятельным фосфатурическим свойством. Снижение αKlotho при неизмененной концентрации FGF23 должно было бы *приводить к увеличению* реабсорбции Pi и снижению его мочевой экскреции. Напротив, во всех примененных моделях в сравнении с контролем относительная и абсолютная экскреция Pi увеличивалась, несмотря на снижение экспрессии αKlotho. Кроме того, в группе SHR(2) в сравнении с SHR(1) была достоверно ниже экспрессия αKlotho, без каких-либо различий в параметрах экскреции Pi с мочой.

Эти факты делают очевидным то, что на ранних стадиях ХБП система αKlotho/FGF23 и PTH не оказывают существенного влияния на выделение почками и баланс Pi. Следует предполагать возможность существования иных, пока малоизвестных механизмов регуляции обмена Pi на ранних стадиях хронической дисфункции почек. Кандидатом на роль первичных фосфотонических факторов, определяющих развитие фосфатурии в эксперименте и клинике, может быть система PHEX-DMP1-MEPE [26]. Известно, что ее регулирующие факторы, в частности пептиды ASARM, образующиеся в результате протеолиза MEPE, обладают и самостоятельными, и опосредованными увеличением FGF23 фосфатурическими эффектами. В свою очередь, MEPE, как и ген αKlotho, регулируется кальцитриолом – снижение последнего приводит к увеличению образования MEPE.

Полученные результаты позволяют заключить, что: а) изменения в системе FGF23/αKlotho происходят существенно раньше развития реакции паращитовидных желез в виде увеличения синтеза PTH; б) снижение экспрессии αKlotho в почке при развитии ранних стадий хронического повреждения является одним из первичных событий, существенно опережающим системную гиперпродукцию FGF23; в) увеличение относительной и абсолютной экскреции фосфатов на ранних стадиях экспериментальной ХБП происходят независимо от αKlotho, FGF23 и PTH.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда фундаментальных исследований (проект №13-04-01886) и ГБОУ ВПО «ПСПбГМУ им. И.П.Павлова» МЗ РФ – грант для молодых ученых в области фундаментальных исследований.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Kestenbaum B, Sampson JN, Rudser KD. Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2005;16(2):520-528

2. Добронравов ВА. Современный взгляд на патофизиологию вторичного гиперпаратиреоза: роль фактора роста фибробластов 23 и Klotho. *Нефрология* 2011;15(4):11-20

3. Craver L, Marco MP, Martнnez I et al. Mineral metabolism parameters throughout chronic kidney disease stages 1-5-achievement of K/DOQI target ranges. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22(4):1171-1176

4. Hruska KA, Mathew S, Lund R et al. Hyperphosphatemia of

chronic kidney disease. *Kidney Int* 2008;74(2):148-157

5. Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. Klotho and chronic kidney disease. *Contrib Nephrol* 2013;180:47-63

6. Razzaque MS, Lanske B. The emerging role of the fibroblast growth factor-23-klotho axis in renal regulation of phosphate homeostasis. *J Endocrinol* 2007;194(1):1-10

7. Hasegawa H, Nagano N, Urakawa I et al. Direct evidence for a causative role of FGF23 in the abnormal renal phosphate handling and vitamin D metabolism in rats with early-stage chronic kidney disease. *Kidney Int* 2010;78:975–980

8. Sakan H, Nakatani K, Asai O et al. Reduced Renal б-Klotho Expression in CKD Patients and Its Effect on Renal Phosphate Handling and Vitamin D Metabolism. PLoS One. 2014;9(1):e86301. doi: 10.1371/journal.pone.0086301

9. Wolf M. Update on fibroblast growth factor 23 in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2012;82(7):737-747

10. Isakova T, Xie H, Barchi-Chung A et al. Fibroblast growth factor 23 in patients undergoing peritoneal dialysis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6:2688–9520

11. Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. The emerging role of Klotho in clinical nephrology. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27(7):2650-2657

12. Takahashi S, Okada K, Nagura Y et al. Three-quarters nephrectomy in rats as a model of early renal failure. *Jpn J Nephrol* 1991;33(1):27-31

13. Береснева ОН, Парастаева ММ, Иванова ГТ. и др. Оценка кардиопротективного действия малобелковой соевой диеты и уровень неорганических анионов сыворотки крови у спонтанно-гипертензивных крыс с нефрэктомией. *Нефрология* 2007;11(3):70-76

14. Ormrod D, Miller T. Experimental uremia. Description of a model producing varying degrees of stable uremia. *Nephron* 1980; 26(5):249-254

15. Feldman HI, Appel LJ, Chertow GM et al. The Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study: Design and Methods. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:148–153

16. Gutierrez O, Isakova T, Rhee E et al. Fibroblast growth factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:2205–2215

17. Larsson T, Nisbeth U, Ljunggren O, et al. Circulating concentration of FGF-23 increases as renal function declines in patients with chronic kidney disease, but does not change in response to variation in phosphate intake in healthy volunteers. *Kidney Int* 2003;64:2272–2279

18. van Husen M, Fischer AK, Lehnhardt A et al. Fibroblast growth factor 23 and bone metabolism in children with chronic kidney disease. *Kidney Int* 2010;78:200–206

19. Martin A, David V, Quarles LD. Regulation and function of the FGF23/klotho endocrine pathways. *Physiol Rev* 2012;92(1):131-155

20. Aizawa H, Saito Y, Nakamura T et al. Downregulation of the Klotho gene in the kidney under sustained circulatory stress in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 249: 865–871

21. Burnett SM, Gunawardene SC, Bringhurst FR et al. Regulation of C-terminal and intact FGF-23 by dietary phosphate in men and women. *J Bone Miner Res* 2006;21:1187–1196

22. Haruna Y, Kashihara N, Satoh M et al. Amelioration of progressive renal injury by genetic manipulation of Klotho gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 2331–2336

23. Wang Y, Sun Z. Klotho gene delivery prevents the progression of spontaneous hypertension and renal damage. *Hypertension* 2009; 54:810–817

24. Moe SM, Radcliffe JS, White KE et al. The pathophysiology of early-stage chronic kidney disease-mineral bone disorder (CKD-MBD) and response to phosphate binders in the rat. *J Bone Miner Res* 2011;26(11):2672-2681

25. Spichtig D, Zhang H, Mohebbi N et al. Renal expression of FGF23 and peripheral resistance to elevated FGF23 in rodent models of polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2014; doi:10.1038/ki.2013.526

26. Rowe PS. Regulation of bone-renal mineral and energy metabolism: the PHEX, FGF23, DMP1, MEPE ASARM pathway. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2012;22(1):61-86

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию: 15.01.2014 г.
Принята в печать: 25.03.2014 г.